

JEANINE MARIE NARDIN

## **ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ULEÍNA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – Área de Análises Clínicas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Almeriane Maria Weffort-Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Sílvio Zanata

Curitiba  
2006

## **NOTA BIOGRÁFICA**

A autora graduou-se em Farmácia – Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná em 2003. Durante a graduação, de julho de 1999 a dezembro de 2002, participou do Programa Especial de Treinamento (PET)/Capes, do Curso de Farmácia, sob orientação da Professora Dra. Maria Suely Soares, onde participou em diversas atividades integrando pesquisa, ensino e extensão. Como parte das atividades de pesquisa, trabalhou como aluna de iniciação científica voluntária na Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFPR, sob orientação do Professor Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo, participando dos projetos “Desenvolvimento de Ensaio Imunoenzimático para Determinação do Hormônio do Crescimento Humano” e “Ensaaios Imunológicos com p53 Mutada para Detecção de Tumor Adrenocortical em Crianças”. Em dezembro de 2002, iniciou sua carreira como farmacêutica hospitalar na Central de Misturas Intravenosas da Unidade de Quimioterapia do Hospital Erasto Gaertner e, em dezembro de 2005, assumiu o cargo de farmacêutica monitora de pesquisa clínica no setor de pesquisa do Centro de Projetos de Ensino e Pesquisa do mesmo hospital. No ano de 2004, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Análises Clínicas, onde desenvolveu projeto sobre atividades biológicas do alcalóide uleína, cujos resultados estão contidos nesta dissertação.

*Dedico este trabalho a todas as  
pessoas que de certa forma me  
amam e amaram.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Ovaldir e Lelis Nardin**, ao meu irmão **Leonardo** e a minha irmã e cunhado **Joyce e Gean**, pelo incansável apoio, estímulo e amor em todos os momentos.

Ao meu pequeno sobrinho e afilhado **Lucca**, pelos incríveis momentos de eterna alegria.

Ao super primo **Flávio**, pois sem ele a vida seria muito chata!

Agradeço à minha orientadora **Prof<sup>a</sup> Almeriane Maria Weffort Santos**, pelo acompanhamento e dedicação, entusiasmo, bons conselhos, ensinamentos e, especialmente, pela amizade, sendo um exemplo de inteligência e perseverança.

Ao meu co-orientador **Prof. Sílvio Zanata**, pela gentileza em oferecer seu laboratório e seu conhecimento, apoio sem o qual a realização deste estudo seria impossível.

Ao **Prof. Bonald Cavalcante de Figueiredo**, pela influência e participação em minha formação acadêmica e por ter possibilitado a realização de parte dos experimentos.

Ao **Prof. Cid Aimbiré de Moraes Santos**, pelo auxílio em minha formação, sugestões e amizade.

A **Irene, Geni e Regina**, pela amizade, atenção e valiosíssima ajuda.

A **Prof<sup>a</sup>. Maria Suely Soares**, por sua dedicação em minha formação acadêmica e pessoal, colaborações que tornaram possível a realização desse trabalho e de qualquer outro em meu longo caminho de vida e adiante.

Aos amigos **Patrícia, Angela, Christian, Caroline, Lisângela, Joy, Virginia, Luciana, Flávia Ludmila, Juliana, Priscila, *meine freudin* Flavinha** e colegas da Pós-Graduação, pelas contribuições e amizade.

A **Fabiana, Walquíria, Wesley e Juliano**, pela inestimável ajuda em meus experimentos e pela amizade.

Aos farmacêuticos e amigos do **Serviço de Farmácia Hospitalar do Hospital Erasto Gaertner**, pela amizade e auxílio, fortalecendo meu aprendizado crítico.

Às farmacêuticas **Heloísa Arruda G. Barreto, Vânia Mari S. Andrzejewski**, e à enfermeira **Luciana Kalinke**, que, de certo modo, possibilitaram este trabalho devido à sua experiência e dedicação à saúde humana, auxiliando e orientando meu crescimento pessoal e profissional nestes últimos anos.

E a todas as pessoas que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Pensamentos tornam-se ações, ações tornam-se hábitos, hábitos tornam-se caráter, e nosso caráter torna-se nosso destino.”*

*James C. Hunter*

## SUMÁRIO

NOTA BIOGRÁFICA.....	ii
DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
EPÍGRAFE.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	lx
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 ALCALÓIDES INDÓLICOS E ULEÍNA.....	2
1.2 MATRIZ EXTRACELULAR .....	5
1.2.1 Fibronectina .....	8
1.2.2 Vitronectina .....	11
1.3 MECANISMOS DE DEFESA.....	12
1.3.1 A resposta inflamatória aguda.....	12
1.3.2 A resposta inflamatória crônica.....	13
1.3.3 A resposta imunitária.....	14
1.3.4 Tipos celulares envolvidos nos mecanismos de defesa imunológica mediados por células.....	20
1.4 ADESÃO CELULAR.....	23
1.5 MOLÉCULAS DE ADESÃO .....	23
1.5.1 Integrinas.....	24
1.6 PRODUTOS NATURAIS EXTRAÍDOS DE PLANTAS MEDICINAIS COMO AGENTES TERAPÊUTICOS .....	27
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
3.1 CASUÍSTICA.....	29
3.2 COMPOSIÇÃO DE SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	29

3.3 OBTENÇÃO DOS LEUCÓCITOS.....	32
<b>3.4 PREPARO DE CITOCENTRIFUGADOS.....</b>	<b>33</b>
3.5 COLORAÇÃO DE MAY-GRUNWALD-GIEMSA.....	33
3.6 VIABILIDADE E CITOTOXICIDADE CELULARES.....	33
3.7 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE FIBRONECTINA DE PLASMA HUMANO POR CROMATOGRAPHIA DE AFINIDADE .....	34
3.7.1 <i>Preparo da coluna de Sepharose-gelatina</i> .....	34
3.7.2 <i>Isolamento de fibronectina em coluna de Sepharose-gelatina</i> .....	34
3.7.3 <i>Purificação de fibronectina</i> .....	34
3.7.4 <i>Quantificação de fibronectina</i> .....	35
3.8 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE VITRONECTINA DE PLASMA HUMANO POR CROMATOGRAPHIA DE AFINIDADE .....	35
3.8.1 <i>Preparo da coluna de Sepharose-heparina</i> .....	35
3.8.2 <i>Isolamento de vitronectina em coluna de Sepharose-heparina</i> .....	35
3.8.3 <i>Purificação de vitronectina</i> .....	36
3.8.4 <i>Quantificação de vitronectina</i> .....	36
3.9 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE).....	36
3.10 COLORAÇÃO DE GEL DE POLIACRILAMIDA .....	36
3.11 <i>WESTERN BLOT</i> .....	37
3.12 OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA ULEÍNA.....	37
3.13 ADESÃO CELULAR A FIBRONECTINA E A VITRONECTINA IMOBILIZADAS.....	38
3.14 PRESENÇA DE MOLÉCULAS DE ADESÃO.....	39
3.15 ENSAIO DE IMUNOMODULAÇÃO .....	39
3.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
4.1 PURIFICAÇÃO DE FIBRONECTINA E VITRONECINA.....	42
4.2 ANÁLISE DA ULEÍNA.....	44
4.3 EFEITO DA ULEÍNA SOBRE A VIABILIDADE DE LEUCÓCITOS HUMANOS .....	45
4.3.1 <i>Obtenção de frações de leucócitos humanos</i> .....	45

4.3.2 Toxicidade da uleína para leucócitos humanos.....	46
4.4 ENSAIO DE ADESÃO.....	49
4.5 EFEITO DA ULEÍNA SOBRE A ADESÃO ESPONTÂNEA DE GRANULÓCITOS HUMANOS À SUPERFÍCIES PLÁSTICAS .....	58
4.6 EFEITO DA ULEÍNA SOBRE A ADESÃO DE LEUCÓCITOS HUMANOS A PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR.....	58
4.7 EFEITO DA ULEÍNA SOBRE A PRESENÇA DE $\alpha_L\beta_2$ , $\alpha_4\beta_1$ E $\alpha_5\beta_1$ NA SUPERFÍCIE CELULAR DE LEUCÓCITOS HUMANOS.....	63
4.8 EFEITO DA ULEÍNA SOBRE A IMUNOMODULAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS.....	73
<b>5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>83</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura básica da molécula dímera de fibronectina e seus domínios de interação.....	9
<b>Figura 2.</b> Estrutura básica do domínio central da vitronectina.....	11
<b>Figura 3.</b> Fibronectina obtida de plasma humano.....	43
<b>Figura 4.</b> Vitronectina obtida de plasma humano.....	44
<b>Figura 5.</b> Perfil cromatográfico da fração alcaloídica extraída de <i>Himatanthus lancifolius</i> .....	45
<b>Figura 6.</b> Toxicidade da uleína sobre leucócitos humanos.....	48
<b>Figura 7.</b> Adesão de leucócitos humanos a fibronectina imobilizada.....	50
<b>Figura 8.</b> Adesão de leucócitos humanos a vitronectina imobilizada.....	51
<b>Figura 9.</b> Efeito da uleína sobre a capacidade adesiva espontânea de leucócitos humanos.....	59
<b>Figura 10.</b> Efeito da uleína sobre a capacidade adesiva de leucócitos humanos à fibronectina.....	60
<b>Figura 11.</b> Efeito da uleína sobre a capacidade adesiva de leucócitos humanos à vitronectina.....	61
<b>Figura 12.</b> Estratégia de seleção das diferentes populações de leucócitos para avaliação da expressão de moléculas de adesão por citometria de fluxo.....	64
<b>Figura 13.</b> Estratégia para análise da presença de moléculas de adesão na superfície celular de monócitos por citometria de fluxo.....	65
<b>Figura 14.</b> Influência da uleína na presença de $\alpha_L\beta_2$ na superfície celular de leucócitos humanos.....	66
<b>Figura 15.</b> Influência da uleína na presença de $\alpha_4\beta_1$ na superfície celular de leucócitos humanos.....	67
<b>Figura 16.</b> Influência da uleína na presença de $\alpha_5\beta_1$ na superfície celular de leucócitos humanos.....	68
<b>Figura 17.</b> Influência da uleína na presença de $\alpha_L\beta_2$ na superfície celular de leucócitos humanos.....	69
<b>Figura 18.</b> Influência da uleína na presença de $\alpha_4\beta_1$ na superfície celular de leucócitos humanos.....	70
<b>Figura 19.</b> Influência da uleína na presença de $\alpha_5\beta_1$ na superfície celular de leucócitos humanos.....	71

<b>Figura 20.</b> Estratégia para análise da atividade imunomodulatória de linfócitos por citometria de fluxo.....	75
<b>Figura 21.</b> Efeito <i>in vitro</i> da uleína sobre a transformação blástica de linfócitos humanos.....	77
<b>Figura 22.</b> Efeito <i>in vitro</i> da uleína sobre a transformação blástica de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina.....	77
<b>Figura 23.</b> Efeito <i>in vitro</i> da uleína sobre a proliferação espontânea e a estimulada por fitohemaglutinina de linfócitos humanos.....	78

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais alcalóides indólicos derivados de monoterpenos com atividade farmacológica.....	3
<b>Tabela 2.</b> Mitógenos: suas características e células alvo.....	19
<b>Tabela 3.</b> Tipos celulares presentes nas subpopulações de leucócitos obtidos de sangue periférico de voluntários sadios, obtidas após centrifugação sobre gradiente de densidade.....	46
<b>Tabela 4.</b> Influência da uleína na morfologia de linfócitos humanos cultivados, avaliada em citocentrifugados corados com May-Grunwald-Giemsa.....	76
<b>Tabela 5.</b> Efeito da uleína sobre a viabilidade de mononucleares humanos cultivados na presença de fitohemaglutinina.....	79

## RESUMO

A família Apocynaceae compreende cerca de 300 gêneros e mais de 3000 espécies. Dentre elas está o *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, conhecida popularmente como agoniada, podendo o alcalóide uleína ser isolado de suas cascas secas. O objetivo deste trabalho foi investigar, *in vitro*, as atividades biológicas deste alcalóide sobre leucócitos humanos. Para tanto, observou-se o seu efeito sobre (1) a capacidade de adesão às moléculas fibronectina e vitronectina imobilizadas, (2) os níveis de expressão das integrinas  $\alpha_L\beta_2$ ,  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_5\beta_1$  em diferentes populações, antes e após exposição ao alcalóide, e (3) sobre o potencial imunomodulatório de mononucleares, particularmente linfócitos, estimulados ou não por fitohemaglutinina. Os resultados apresentados revelaram ser a uleína um alcalóide dotado de potencial antiinflamatório, uma vez que demonstrou interferir significativamente com a adesão de leucócitos humanos a fibronectina e a vitronectina purificadas de plasma humano e imobilizadas sobre superfícies plásticas por diminuir a expressão das integrinas  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_5\beta_1$  expressos nessas células. O alcalóide também demonstrou potencial imunomodulatório, refletido na capacidade de inibir a proliferação de linfócitos humanos induzida por mitógeno, provavelmente por atuar nos mecanismos de ativação celular. Os resultados obtidos e as informações contidas neste trabalho devem, portanto, ser explorados em modelos *in vivo*, a fim de esclarecer se a uleína pode representar uma alternativa terapêutica para o tratamento de doenças que envolvem as respostas inflamatória e imunitária.

**Palavras chave:** uleína, *Himatanthus lancifolius*, fibronectina, vitronectina, integrinas.

## ABSTRACT

*The Apocynaceae family contains more than 3000 species under at least 300 genres. Amongst them, there is the Himatanthus lancifolius (Muell. Arg.) Woodson, popularly known as agoniada that contains the indole alkaloid uleine, which can be isolated from its dried barks. The aim of this work was to investigate the biological properties of this alkaloid upon human leukocytes in vitro. To accomplish this, the uleine effects (1) on immobilized fibronectin and vitronectin leukocyte adhesion, (2) the  $\alpha_L\beta_2$ ,  $\alpha_4\beta_1$  and  $\alpha_5\beta_1$  expression, before and after alkaloid exposition, and (3) on the immunomodulatory potential of human mononuclear cells, particularly lymphocytes, under basal and phytohemagglutinin stimulation, were studied. The results herein presented revealed an anti-inflammatory potential for uleine, as it significantly inhibited the adhesion of human leukocytes to human plasma fibronectin and vitronectin by down regulating the expression of  $\alpha_4\beta_1$  and  $\alpha_5\beta_1$  integrins. Also, the alkaloid presented an immunomodulatory effect, reflected on its potential capacity to inhibit the human lymphocytes proliferation induced by mitogen, probably by acting at the cellular activation mechanism level. These results should be further explored in vivo experimental models with the aim of clarifying whether the alkaloid uleine can represent a new therapeutic alternative for the treatment of disturbances related to inflammatory and immune responses.*

**Key words:** uleine, *Himatanthus lancifolius*, fibronectin, vitronectin, integrins.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais no tratamento de diversos estados patológicos é tradicional na cultura humana e data de milhares de anos (Buss e Waigh, 1995; Mans et al., 2000) e as primeiras evidências do seu uso pelo ser humano remontam o período Neanderthal (Winslow e Kroll, 1998). Sem dúvida, a fitoterapia é considerada a medicina mais antiga por excelência e teve, como primeiros disseminadores, os pensadores Hipócrates, Dioscórides e Galeno (Alonso, 1998).

O século XV marcou o início da disseminação do conhecimento sobre plantas medicinais e prática médica, na forma de compêndios. Escritos por vários autores europeus, estas obras compilavam informações acerca de centenas de plantas medicinais (Stary, 1998).

Durante séculos, trezentas mil espécies de vegetais superiores foram a principal fonte de medicamentos para o ser humano (Duke, 1990). Com o desenvolvimento da química orgânica, marcada pelo isolamento da morfina pelo farmacêutico Friedrich Wilhelm Sertürner em 1805, foi construído o alicerce para o desenvolvimento da Química Farmacêutica, que visa nada menos que a descoberta, o desenvolvimento, a identificação e a interpretação do modo de ação dos compostos biologicamente ativos em nível molecular, relacionando a estrutura química com a atividade farmacológica (Stary, 1998). O ópio, do qual a morfina e a codeína são obtidas, é um dos melhores exemplos dessa ciência. A atropina, alcalóide da *Atropa belladonna*, usada como midriático e antiespasmódico, ou os glicosídeos cardiotônicos extraídos da *Digitalis purpurea* poderiam iniciar uma lista infinda de produtos extraídos de plantas que foram e continuam sendo utilizados regularmente na prática médica.

Além disso, produtos derivados de plantas têm sido usados como modelos para o desenvolvimento de uma série de outros medicamentos sintéticos importantes. Há, ainda, aqueles em que, havendo elucidação de sua estrutura química básica, têm sido usados como protótipos para síntese de medicamentos. Por exemplo, a papaverina, outro alcalóide derivado do ópio, foi usada como base para a construção do veparamil, medicamento importante no tratamento de doenças cardiopulmonares e da hipertensão. Nessa mesma linha situa-se a aspirina, derivada da salicina, metabólico secundário originalmente isolado da *Filipendula*

*ulmaria*, com um amplo espectro de atividades biológicas. Os esteróides diosgenina e hecogenina permanecem como compostos chave na síntese de muitos contraceptivos orais à disposição da clínica médica nas prateleiras de farmácias e drogarias (Buss e Waigh, 1995).

O enfoque médico predominante no último século procurou decompor o homem em órgãos, tecidos e células. Este tipo de terapia normalmente compreende, de maneira isolada, o funcionamento das partes do corpo e esta visão mecanicista acabou por trazer grandes avanços no que se refere ao tratamento tanto de processos crônicos e agudos, como infecto-contagiosos.

A pesquisa relacionada com as plantas que possuem propriedades medicinais envolve uma série de fatores, desde a cultura popular até a metodologia técnica que avalia os efeitos farmacológicos da espécie vegetal.

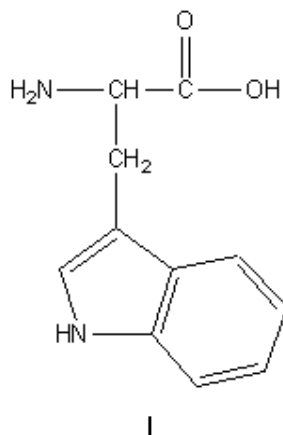
No Brasil, como em todo o mundo, tem sido crescente o uso de plantas medicinais como terapia alternativa e/ou de suporte às terapias convencionais, principalmente pela maior circulação de informações na mídia, além de oferecerem o menor custo e poucos, quando existentes, efeitos colaterais. Sabe-se que cerca de 80% da população mundial vive em países de terceiro mundo e faz uso de produtos naturais para o tratamento de problemas primários de saúde (Mans et al., 2000) enquanto que, dos 20% restantes, habitantes do chamado primeiro mundo, um quarto pelo menos faz uso de medicamentos diretamente derivados de plantas. Em contraste, somente cerca de 10% das espécies de plantas, fungos e bactérias conhecidas foram estudadas, deixando um universo para serem testadas e, eventualmente, usadas contra os males da saúde.

### 1.1. ALCALÓIDES INDÓLICOS E ULEÍNA

A terminologia “alcalóide” compreende um grupo heterogêneo de substâncias extraídas de produtos naturais, em particular plantas, com atividades farmacológicas extremamente diversificadas.

Um dos maiores grupos de alcalóides complexos derivam do triptofano (I) e estão presentes em fungos e em plantas, principalmente das famílias Apocynaceae,

Rubiaceae e Longaniaceae. Dentre eles, os alcalóides indólicos derivados de monoterpenos abrigam mais de mil membros (Cordell, 1981).



A Tabela 1 apresenta, de forma resumida, alguns desses componentes, destacados pela sua relevante importância terapêutica.

**Tabela 1.** Principais alcalóides indólicos derivados de monoterpenos com atividade farmacológica.

COMPOSTO	FONTE	ATIVIDADE FARMACOLÓGICA
Ajmalicina	<i>Catharanthus roseus</i>	hipotensora
Ajmalina	<i>Rauvolfia</i> sp.	antiarrítmico
Camptotecina	<i>Camptotheca acuminata</i>	antitumoral
Deserpidina	<i>Rauvolfia canescens</i>	hipotensora
Ibogaína	<i>Tabernanthe iboga</i>	psicotomimético
Vincristina	<i>Catharanthus roseus</i>	antitumoral
Vimblastina	<i>Catharanthus roseus</i>	antitumoral
Quinidina	<i>Remija</i> sp.	cardiodepressor
Quinina	<i>Cinchona</i> sp	atimalárico
Rescinnamina	<i>Rauvolfia</i> sp.	hipotensora
Reserpina	<i>Rauvolfia vomitória</i>	hipotensora
Estricnina	<i>Strychnos nux vomica</i>	neurodepressor
Vincamina	<i>Vinca major</i>	hipotensora

Adaptado de Cordell, 1981.



Neste grupo, estão incluídos a vimblastina e a vincristina, isolados da *Catharanthus roseus*, Linn., com reconhecida ação antineoplásica, relatada para diversas formas de câncer (Anderson et al., 1996; Carlson et al., 1990; Hamel, 1996; Koch e Coussens, 1993; Lens e Eisen, 2003; Martinelli et al., 2003; Miller et al., 1997; Noble et al., 1958; Svoboda, 1958).

A família Apocynaceae compreende cerca de 300 gêneros e mais de 3000 espécies. No Brasil, existem cerca de 370 espécies distribuídas em 41 gêneros (Woodson, 1938) descritos como árvores, arbustos, ervas ou trepadeiras. Os representantes da família Apocynaceae são tradicionalmente conhecidos pela presença de alcalóides derivados do triptofano, apresentando um núcleo indólico responsável pela potente habilidade de promover relevantes mudanças fisiológicas (Cordell, 1981).

A espécie *Plumeria lancifolia* foi primeiramente descrita por Mueller e Argovis em 1860. Subseqüentemente, foi classificada como *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson e, desde 1929, faz parte das monografias da Farmacopéia Brasileira I (Farmacopéia Brasileira, 1929). Conhecida popularmente como agoniada, cresce como planta nativa em diferentes regiões do Brasil, particularmente em Minas Gerais, Espírito Santo, Rio Grande do Sul, Goiás e Amazônia, sendo utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas condições cutâneas, asma, sífilis, e, principalmente, como estimulador das contrações uterinas, auxiliando na concepção e como regularizador de ciclos menstruais (Corrêa, 1952).

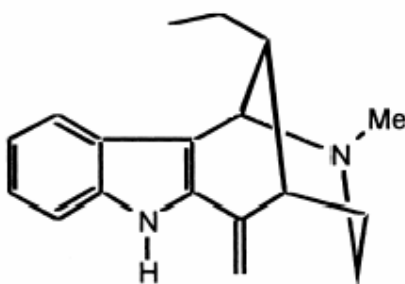
Extratos brutos demonstraram atividade anti-ulcerante (Finau et al., 1996). Recentemente demonstrou-se que a fração alcaloídica obtida das cascas de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson foi capaz de, significativamente, reduzir a resposta contrátil da musculatura lisa vascularizada do jejuno e da aorta de ratos induzida pela acetilcolina e fenilefrina, respectivamente, por atuar na mobilização ou utilização de  $Ca^{++}$  intracelular (Rattmann et al., 2005). Interessante no contexto deste trabalho é o fato de que, dentre os alcalóides identificados nesta fração, a uleína era a de concentração majoritária.

Investigações em andamento em nossos laboratórios indicam relevante potencial antiinflamatório para este alcalóide, onde estudos *in vitro* têm demonstrado

sua capacidade de inibir, de forma significativa, a quimiotaxia de granulócitos humanos induzida por caseína.

A uleína pode ser isolada de cascas secas de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson (Coimbra, 1994) e foi obtida, pela primeira vez, a partir do extrato metanólico preparado de cascas das raízes de *Aspidosperma ulei* Mgf. (Schmutz et al., 1957). Sua estrutura (Büchi e Warnhoff, 1959) e estereoquímica (Gaskell e Joule, 1967) foram deduzidas subsequentemente e a confirmação de sua estrutura foi obtida através de síntese estereocontrolada (Buchi e Warnhoff, 1959).

A uleína (II) apresenta a forma molecular  $C_{18}H_{22}N_2$ , ponto de fusão 74-79°C, com absorção máxima no ultravioleta nos comprimentos de onda 209, 305, 316 nm (Franca et al., 2000). Embora conhecida há mais de meio século, são raros os relatos científicos de suas atividades biológicas.



II

## 1.2. MATRIZ EXTRACELULAR

Os tecidos não são constituídos somente por células. Grande parte de seu volume é espaço extracelular, o que é, em parte, preenchido pela matriz extracelular (MEC), composta por uma grande variedade de macromoléculas secretadas localmente, formando uma rede organizada, em estreita associação com a superfície celular que a produz (Engel e Prockop, 1991), a qual, além de servir como suporte físico, possui múltiplas funções biológicas. Dentre essas, destacam-se a de reservatório de diferentes hormônios, que controlam o crescimento e a diferenciação celulares, e a de prover uma estrutura em malha, na qual as células podem

locomover-se, aderir, promover trocas entre si e com o ambiente. É essencial, também, na regulação da forma e reorganização do citoesqueleto celulares, na migração e na diferenciação durante a embriogênese. Destaca-se na recuperação de lesões e feridas, por facilitar a localização de macrófagos e outras células do sistema imunitário à área lesada (Alberts et al., 2002).

As variações nas quantidades relativas dos diferentes tipos de macromoléculas e o modo no qual elas estão organizadas na MEC dá origem a uma surpreendente diversidade de formas, cada uma adaptada às necessidades funcionais de um determinado tecido.

A visão que se deve ter sobre a MEC é dinâmica, uma vez que as células são as responsáveis pela síntese e fornecimento de seus constituintes, os quais interagem entre si, formando uma contínua relação estrutural e de intercâmbio funcional entre o citoplasma, a membrana celular e a própria MEC. Como consequência, o metabolismo, o destino, a morfologia, a adequação celular e tecidual entre outras dinâmicas e processos celulares, estão contínua e intimamente relacionados com a composição e organização da MEC (Hay, 1981).

A MEC compõe-se, primordialmente, por duas classes principais de macromoléculas: (a) cadeias de polissacarídeos denominadas glicosaminoglicanos (GAGs), que se ligam covalentemente à proteínas na forma de proteoglicanos (Jeanloz, 1960), e (b) glicoproteínas, caracterizadas por proteínas fibrosas, incluindo diversos tipos de colágenos e fibronectinas, além de elastina e lamininas, dentre outras, que exercem funções adesivas estruturais.

Os glicosaminoglicanos, inicialmente denominados mucopolissacarídeos (Meyer 1938), são formados de cadeias polissacarídicas não-ramificadas, compostas de unidades dissacarídeas repetidas. São chamadas de glicosaminoglicanos porque um dos dois açúcares no dissacarídeo repetido é sempre um amino açúcar (*N*-acetilglucosamina ou *N*-acetilgalactosamina), o qual, na maioria das vezes, é sulfatado. O segundo açúcar é, normalmente, um ácido urônico (glucurônico ou idurônico). Os grupos sulfato ou carboxil ocorrem na maioria dos açúcares e, por isso, os GAGs são carregados negativamente, sendo o grupo de moléculas mais aniônico produzido pelas células animais.

Há quatro principais grupos de GAGs, de acordo com seus açúcares, o tipo de ligação entre os açúcares e o número e localização dos grupos sulfato: (1)

hialuronana, (2) condroitin sulfato e dermatan sulfato, (3) heparan sulfato e (4) queratan sulfato. Nos tecidos de mamíferos há, pelo menos, sete tipos de GAGs: (1) heparina, (2) heparan sulfato, (3) 4-condroitin sulfato, (4) 6-condroitin sulfato, (5) dermatan sulfato, (6) queratan sulfato e (7) ácido hialurônico (Dietrich, 1984).

As cadeias polissacarídicas são muito rígidas para dobrarem-se em estruturas globulares compactas, como as formadas pelas cadeias peptídicas; além disso, são fortemente hidrofílicas. Assim, os GAGs tendem a adotar uma conformação altamente estendida, ocupando um grande volume com relação à sua massa, e formam géis em concentrações muito baixas. A alta densidade de cargas negativas atrai uma nuvem de cátions, principalmente  $\text{Na}^+$  osmoticamente ativo, fazendo com que grande quantidade de água seja absorvida pela matriz, criando uma pressão por inchaço, que permite que a matriz suporte forças de compressão.

As glicoproteínas fibrosas constituem a MEC fibrilar e o colágeno é a principal proteína estrutural dos vertebrados. Sendo uma família de proteínas fibrosas encontradas em todos os animais multicelulares, são secretadas, principalmente, pelas células do tecido conjuntivo e sua principal característica é a estrutura longa e rígida de sua fita tripla helicoidal, na qual três cadeias polipeptídicas denominadas  $\alpha$ , enroladas umas às outras, formam uma estrutura com aspecto de corda torcida. Até o momento, cerca de 25 diferentes cadeias  $\alpha$  de colágenos já foram identificadas, cada uma codificada por um gene específico. Diferentes combinações desses genes são expressas em diferentes tecidos. Embora, em princípio, mais de 10 mil tipos de moléculas de colágeno de tripla hélice possam ser reunidas pelas várias combinações possíveis entre as 25 cadeias  $\alpha$ , somente cerca de 20 tipos de moléculas de colágenos foram encontrados em mamíferos (Alberts et al., 2002).

Os principais tipos de colágenos encontrados no tecido conjuntivo de mamíferos são os tipos I, II, III e XI, sendo o tipo I o principal colágeno da pele, ossos e, também, o mais comum. Esses são colágenos fibrilares, ou colágenos formadores de fibrilas, com estrutura também semelhante a uma corda (Alberts et al., 2002). Por muitos anos foi atribuída ao colágeno uma função apenas de suporte e resistência mecânica. No entanto, resultados obtidos nas últimas décadas mostraram que os colágenos estão envolvidos nos fenômenos de adesão e diferenciação celular (Hay, 1981).

Outra glicoproteína fibrilar da MEC é a elastina, a qual se caracteriza como uma rede de fibras elásticas na matriz celular de tecidos como a pele, vasos sanguíneos e pulmões, que necessitam de forças elásticas para exercerem sua função. As fibrilas elásticas são, pelo menos, cinco vezes mais extensíveis que a borracha de mesma área transversal. As longas e inelásticas fibrilas de colágeno são entrelaçadas com as fibras elásticas para limitar a distensão e evitar que o tecido rasgue (Alberts et al., 2002).

As lamininas são uma das primeiras moléculas da MEC que aparecem nos mamíferos e desempenha funções específicas na interface epitélio-conjuntivo, como filtro, regulando a passagem de proteínas entre estes compartimentos, ou como barreira, prevenindo o contato do epitélio com muitos tipos celulares (exceto macrófagos, linfócitos e células nervosas). Ainda, conecta células adjacentes na musculatura lisa (Sanes et al., 1990), mantém a integridade de diferentes tecidos e serve como um substrato para a migração celular em tecidos que foram danificados. Neste contexto, tem relevância na disseminação de células tumorais malignas (Liotta, 1992). Exerce, também, papel crucial na adesão, proliferação, migração e diferenciação celular em diversos tipos celulares (Colognato e Yurchenco, 2000).

Fazem parte do grupo de glicoproteínas da MEC, ainda, a fibronectina e a vitronectina. Estas proteínas, juntas, presentes no plasma e no soro de mamíferos, caracterizam-se como importantes proteínas da MEC relacionadas aos processos da adesão celular como será detalhado a seguir.

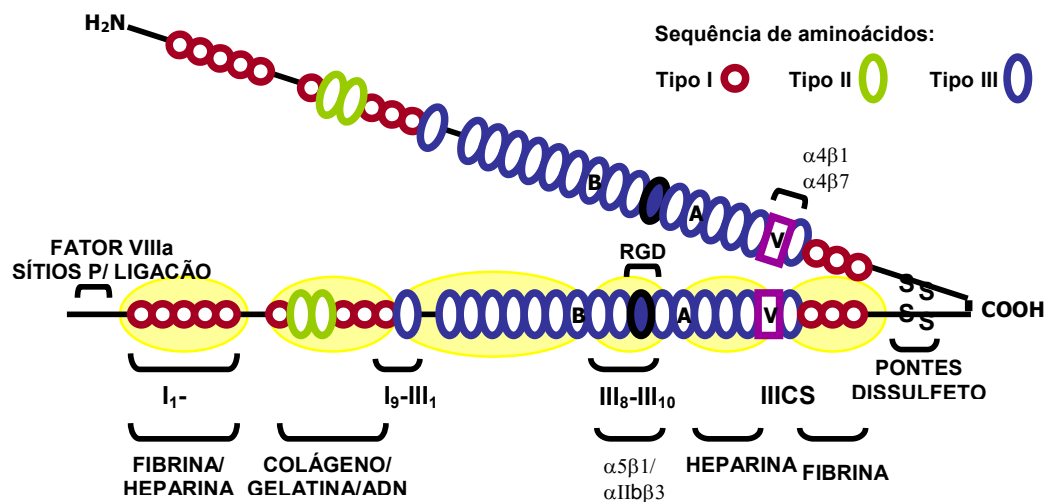
### *1.2.1 Fibronectina*

Um dos componentes mais bem caracterizados da matriz extracelular é a fibronectina (FN). Existindo sob uma variedade de isoformas, está presente no plasma na forma solúvel e, na forma insolúvel na MEC, ao lado das células que formam o tecido conjuntivo e as membranas basais. Participa de uma grande variedade de interações celulares com a MEC e apresenta especial papel nas funções de adesão, migração e diferenciação celulares (Magnusson e Mosher, 1998).

Os estudos acerca da fibronectina iniciaram-se em meados da década de 70 por vários grupos, a partir da descoberta de uma proteína presente na superfície de

fibroblastos (Ruoslahti e Vaheri, 1974), e culminaram com o esclarecimento de sua atividade mais célebre, caracterizada por sua habilidade em interagir com células a fim de promover a adesão das mesmas a um determinado tecido. A caracterização da FN como uma proteína da MEC e também como uma proteína de superfície celular, juntamente com as evidências de que ela poderia ligar-se à inúmeras outras proteínas, mais significativamente ao colágeno (Engvall e Ruoslahti, 1977), glicosaminoglicanos, proteoglicanos e fibrinogênio (Perkins et al., 1979), completavam um cenário que a mostrava como um agente da MEC responsável pela promoção da adesão celular.

A digestão proteolítica branda da molécula de FN demonstrou que sua cadeia polipeptídica consiste de seis domínios (Figura 1), sendo que cada domínio contém seqüências repetitivas de aminoácidos usados para classificar a molécula em três tipos diferentes, a saber, tipos I, II e III (Skorstengaard et al., 1984).



**Figura 1. Estrutura básica da molécula dímera de fibronectina e seus domínios de interação.** Digestão proteolítica resulta nos fragmentos Tipos I, II e III. A: extradomínio A; B: extradomínio B; ADN: ácido desoxirribonucléico. Adaptado de Magnusson e Mosher, 1998

O tipo I apresenta-se repetido cerca de 45 vezes e aparece finalizando tanto a porção amino-terminal quanto a carboxi-terminal da molécula. Dois grupamentos de

60 aminoácidos tipo II interrompem os nove grupamentos dos peptídeos tipo I da porção NH<sub>2</sub>-terminal. E, finalmente, 15 a 17 segmentos de aminoácidos tipo III, cada um com cerca de 90 aminoácidos, correspondem a porção central da molécula (Ruoslahti, 1988).

Todas estas porções reunidas formam um polipeptídeo com cerca de 2500 aminoácidos. A molécula em si é constituída de duas cadeias polipeptídicas associadas, próximo a extremidade COOH-terminal, por pontes dissulfeto, formando um dímero com peso molecular de aproximadamente 450 kDa (Manabe et al., 1997).

Comparações entre moléculas de FN de várias fontes revelaram diferenças no peso molecular da molécula. A FN isolada do plasma, por exemplo, consiste em polipeptídeos que diferem um dos outros quanto ao peso molecular e são relativamente menores do que aqueles produzidos por diferentes linhagens celulares mantidas em cultura (Yamada e Kennedy, 1979).

A FN circulante no sangue é secretada pelo fígado, enquanto a produzida por fibroblastos, monócitos, células endoteliais, células estromais da medula óssea, dentre outras células, associa-se a superfícies celulares, membranas basais, matrizes pericelulares e a um número de outros componentes da MEC, incluindo colágeno, fibrina, heparina e proteoglicanas, via domínios específicos e, às células, via receptores de integrinas (Ruoslahti, 1988). É importante ressaltar que a FN também atua como a principal opsonina no soro humano, exercendo funções tanto na defesa do hospedeiro quanto no reparo de lesões (Blystone et al., 1994).

Como já citado, a FN pode ser clivada por proteólise em domínios funcionais. Foi demonstrado que seu domínio de ligação ao colágeno e à região de ligação celular apresentavam-se em fragmentos separados (Ruoslahti e Engvall, 1978) e, posteriormente, esforços foram feitos para elucidar os demais sítios de ligação. Estes sítios incluem aqueles que interagem com a fibrina, com a heparina N-terminal e grupos de bactérias do gênero *Staphylococcus*, todos em um único domínio, e os que interagem com o colágeno, com células, com a heparina C-terminal e com o fibrinogênio, todos em domínios distintos (Ruoslahti, 1988).

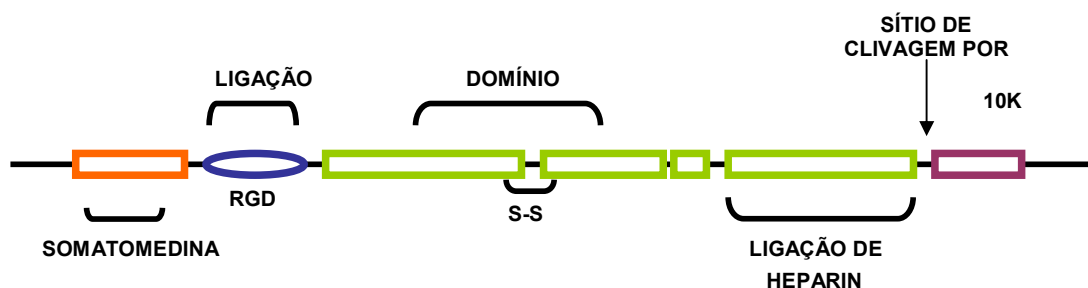
A porção da FN responsável pela sua ligação com células localiza-se na região central da molécula, em um dos segmentos de peptídeos tipo III. Este segmento apresenta a seqüência tripeptídica arginina-glicina-ácido aspártico (Arg-Gly-Asp) conhecida como RGD, uma região de reconhecimento exposta na

superfície da molécula (Pierschbacher et al., 1983; Pierschbacher et al., 1981). Esta sequência também está presente em outras proteínas da MEC, como o colágeno, o fibrinogênio e a vitronectina (Hayman et al., 1985), e tem a mesma função, ou seja, a de interagir com diferentes tipos de células.

Importante destacar que, dentre os sítios da FN relacionados à ligação com a heparina, o localizado próximo à porção COOH-terminal, mais precisamente na região que compreende três grupamentos de peptídeos tipo III (Kornblihtt et al., 1985; Skorstengaard et al., 1986), quando ligado a proteoglicanos da superfície celular, pode aumentar a interação entre a célula e a molécula de FN, desencadeando sinalizações intracelulares (Woods et al., 1993).

### 1.2.2 Vitronectina

Também conhecida como proteína S, a vitronectina (VN) é uma das mais importantes glicoproteínas relacionadas à adesão celular presente no plasma e no soro de mamíferos, junto com a fibronectina. É uma molécula monomérica que se apresenta como uma mistura de polipeptídios de 75 e 65 kDa (Akama et al., 1986; Barnes e Silnutzer, 1983; Hayman et al., 1983; Suzuki et al., 1984), cuja estrutura esquemática está ilustrada na Figura 2.



**Figura 2.** Estrutura básica do domínio central da vitronectina.

Semelhante à FN, tem a característica de ligar-se à heparina (Hayman et al., 1983) e ao colágeno (Gebb et al., 1986). Neste particular, a VN apresenta importantes implicações no processo de trombose, sendo uma proteína relacionada



com a hemostasia, ao regular os sistemas de coagulação e o fibrinolítico. Entre as funções da VN tem-se a estabilização do inibidor do ativador tecidual de plasminogênio tipo 1 (PAI-1), ao formar, com este, dímeros e multímeros estáveis mantidos por ligações dissulfetos, que regulam a atividade funcional do PAI-1. A VN apresenta um efeito antitrombótico ao inibir a agregação plaquetária (Tomasini e Mosher, 1991). Além disso, interage com o complexo trombina-antitrombina III(III e Ruoslahti, 1985), ao complexo C5b-9 (Muller-Eberhard, 1984), à estreptococos (Fuquay et al., 1986) e a uma variedade de tipos celulares, como leucócitos e células de linhagens tumorais.

O sítio de ligação celular com a VN também envolve a região RGD (Ruoslahti e Pierschbacher, 1986; Suzuki et al., 1985). A estrutura básica do domínio central da VN inicia-se na região amino terminal, caracterizada como a região da somatomedina-B (resíduos 1 a 44); contém um segmento que apresenta a maior região de resíduos envolvidos na ligação celular (resíduos 45 a 47); uma região altamente acidificada (resíduos 53 a 64), seguido de repetições semelhantes à hemopexina (proteína plasmática ligante do grupamento heme); uma região de ligação aos glicosaminoglicanos, representada por 40 amino ácidos ricos em resíduos básicos; uma região sensível a proteases susceptíveis a altas concentrações de trombina e, por fim, uma região carbóxi-terminal proteína quinase A dependente de fosforilação, adjacente ao sítio de clivagem de proteases (Suzuki et al., 1984).

### 1.3 MECANISMOS DE DEFESA

#### *1.3.1 A resposta inflamatória aguda*

A reação orgânica aguda que se verifica por ocasião de uma inflamação ou infecção é, fundamentalmente, uma resposta de defesa e proteção do organismo lesado contra um agente agressor e as conseqüências que ele pode vir a causar. É um fenômeno estereotipado, cujos sinais rubor, tumor, calor e dor foram primeiramente descritos por Celsius há 178 a.C. e, a estes, Galeno adicionou a perda de função (Cotran et al., 1994). Atualmente, sabe-se que estes sinais são conseqüências da liberação de substâncias químicas encontradas no local da lesão, particularmente as citocinas (Sedgwick e Willoughby, 1985; Silva, 1978).

No decorrer de um processo infeccioso ou inflamatório agudo, os leucócitos circulantes no sangue periférico aproximam-se da parede vascular devido à sua ativação por mediadores da inflamação, liberados por elementos presentes na área de lesão, tais como bactérias, células lesadas ou frações do complemento, passando a ocupar uma posição mais periférica. Em seguida, aderem-se firmemente, mas de forma transitória, ao endotélio e atravessam a parede do vaso (Smith et al., 1979). Após a diapedese, continuam a migrar em direção ao foco inflamatório pelo processo de quimiotaxia (Dekker e Segal, 2000).

Dessa forma, pelo menos três etapas estão distintamente envolvidas no desenvolver de um processo inflamatório agudo: (1) adesão dos leucócitos ao endotélio, (2) sua passagem através do endotélio vascular e (3) migração em direção ao estímulo quimiotático (Dekker e Segal, 2000; Mackai e Rosen, 2000).

Das células com grande capacidade de responder a estímulos inflamatórios destacam-se os granulócitos (GRN) circulantes no sangue periférico. Dentre esses, há os neutrófilos, também conhecidos como polimorfonucleares (PMN), que constituem a população celular primária na defesa aguda contra vários tipos de microorganismos presentes no meio ambiente, acumulando-se rapidamente no sítio invasivo ou de lesão. Sua participação no processo inflamatório é multifuncional e envolve (a) reconhecer seletivamente o agente agressor, (b) responder apropriadamente por meio de locomoção, (c) fagocitose do microorganismo e sua (d) subsequente destruição. Para tanto, possuem a habilidade de secretar substâncias não só capazes de retardar a disseminação da infecção, mas, quando necessário, também recrutar outros tipos de leucócitos para o foco infeccioso/inflamatório (Cassatela, 1995).

O neutrófilo é uma célula que participa da defesa inata e, nos tecidos, está presente em todas as portas de entrada do organismo humano que fazem contato com o meio externo. Com um tempo de vida média na circulação de aproximadamente sete horas (Quesenberry e Colvin, 2001), passam a maior parte desse tempo trafegando no sangue periférico, num processo passivo.

Para que o organismo possa atender a uma demanda tecidual extra de PMN como, por exemplo, no combate a patógenos invasores ou em uma inflamação aguda, a medula óssea dispõe do *pool* de reserva, composto por neutrófilos segmentados e seus precursores imediatos, os neutrófilos bastonetes e os

metamielócitos. Assim, quando necessário, um maior número de neutrófilos pode ser lançado na corrente circulatória, colaborando com a leucocitose observada, geralmente acompanhada do aumento do número de formas segmentadas (neutrofilia) e de bastonetes (Lee et al., 1999).

Quando os processos fisiológicos imediatos da resposta inflamatória não conseguem eliminar o agente agressor, com persistência dos efeitos lesivos por ele causado, instala-se uma situação crônica, cuja longevidade acaba por comprometer a saúde do indivíduo. A exposição prolongada a agentes endógenos com potencial tóxico, quando não eliminados, podem também levar a uma condição inflamatória crônica (Cotran et al., 1994).

### *1.3.2 A resposta inflamatória crônica*

Em contraste com a reação aguda, a inflamação crônica caracteriza-se por uma maior infiltração de células mononucleares (MNC), incluindo macrófagos, linfócitos e plasmócitos, como reflexo de lesão tecidual persistente (Cotran et al., 1994). Dentre essas células, os macrófagos ocupam posição de destaque comparável ao papel principal desempenhado pelos PMN na reação aguda.

Os macrófagos são células que se originam dos monócitos circulantes que, por sua vez e à semelhança dos GNC, são descendentes de progenitores hematopoiéticos presentes na medula óssea (Lee et al., 1999). Após diapedese, os monócitos se distribuem nos mais diferentes tecidos do organismo dos mamíferos, onde se transformam em macrófagos especializados, recebendo, inclusive, nomenclatura de acordo com o tecido onde residem (Reeves e Todd, 2000).

Em contraste com um tempo de vida de cerca de 24 horas para os monócitos circulantes, os macrófagos sobrevivem por vários meses, durante os quais, ao responderem a vários estímulos, especialmente de citocinas, tornam-se ativados e capazes de exercer inúmeras funções, como proliferação, síntese, armazenamento e secreção de moléculas biologicamente ativas (enzimas proteolíticas, componentes do sistema complemento, fibronectina,  $\alpha_2$ -macroglobulina, fatores de coagulação, prostaglandinas, fatores de crescimento, citocinas *etc*), atuam como células apresentadoras de antígenos para linfócitos, tornando-se coadjuvantes indispensáveis na resposta imunitária, produzem reagentes metabólitos do oxigênio

e outras moléculas importantes para a eliminação de microorganismos, além de participarem ativamente nos processos de reparo e regeneração tecidual (Cotran et al., 1994; Reeves e Todd, 2000).

Assim como acontece com os neutrófilos, monócitos são continuamente recrutados da circulação por responderem com avidez aos estímulos recebidos. Em contrapartida, todas as células envolvidas nos mecanismos de defesa exercem, com competência, suas funções, amplificando o quadro inespecífico de uma resposta inflamatória persistente.

### *1.3.3 A resposta imunitária*

Após a instalação de um agente patogênico, o organismo reage para a eliminação do mesmo numa ação integrada entre os fagócitos, protagonistas da reação inflamatória, e as células do sistema imunitário ou imunológico.

O local da infecção e o tipo de patógeno são fatores determinantes do tipo de resposta imunológica que será desencadeada. A resposta imunológica adaptativa desenvolve-se após o contato entre as células do sistema e um patógeno como, por exemplo, vírus, bactérias ou protozoários, o que lhe confere caráter de especificidade (Roitt et al., 2003). Estas células são capazes de identificar e reagir somente com as moléculas que são estranhas ao organismo. Um outro fator que colabora para a ativação do sistema imunitário adaptativo é o fato da agressão pelo agente ser reincidente, pois uma característica específica deste sistema é a produção de uma memória imunológica a partir da primeira infecção (Parham, 2001).

Devido às suas importantes características de memória, especificidade e reconhecimento do não próprio, o sistema imunitário adaptativo é mais rápido e eficaz na defesa do organismo. Os tipos celulares que medeiam esta reação são os linfócitos, em particular os B e T, e as células apresentadoras de antígenos (APC), representadas por uma coleção de monócitos, macrófagos e células dendríticas (Roitt et al., 2003), os quais serão revistos com mais detalhes posteriormente.

Existem, além das barreiras naturais, respostas imunes inespecíficas que se desenvolvem para combater qualquer invasor que se atreva a penetrar nas barreiras naturais e infectar o organismo. A resposta inespecífica significa aquela resposta em que não há um combate contra um epítopo, mas sim contra um antígeno que estiver

no local, não sendo ele específico, mas qualquer substância estranha que esteja em contato com ele (como uma célula envolvida por imunoglobulina ou célula tumoral). Neste tipo de resposta estão presentes as células como os macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, células NK e o sistema complemento.

O modo pelo qual um antígeno é reconhecido pelos receptores presentes na superfície de linfócitos T e B é específico e isso reflete as diferentes funções dessas células após sua ativação pelo antígeno.

Um linfócito B ativado pode transformar-se num plasmócito produtor de imunoglobulinas específicas ao antígeno, inicialmente apresentado. A função desses anticorpos é ligar-se diretamente ao antígeno que lhe deu origem, com a finalidade de neutralizar sua atividade ou de desencadear mecanismos de defesa que culminem na sua eliminação. Na prática, isso significa que células B podem interagir com o antígeno na sua forma nativa, sem modificações (Brostoff e Male, 1994; Reeves e Todd, 2000).

Já os linfócitos T regulam a atividade das outras células do sistema imunitário ou eliminam as células infectadas. Portanto, interações com outros tipos celulares são necessárias para que as células T possam desempenhar sua função. Esta é uma das razões que explica porque, em contraste com os linfócitos B, os T podem reconhecer e ser ativados por antígenos ligados a glicoproteínas específicas do MHC presentes na superfície das APC, codificadas pelos genes do HLA, processo que é denominado *duplo reconhecimento*, pois receptores de células T não se ligam ao antígeno ou às moléculas do MHC independentemente, mas à combinação de ambos.

A função básica das APC é ativar linfócitos T e eliminar, por endocitose, células alvo que foram mortas por estes, ou eliminar antígenos que foram neutralizados por anticorpos.

Muitos antígenos em seu estado natural não conseguem se associar eficientemente às moléculas do MHC e o fazem somente após terem sido processados pelas APC. Este processamento envolve sua parcial degradação enzimática, liberando unidades peptídicas de tamanho e sequência apropriada para se ligarem às moléculas do MHC e, então, servirem como epítomos para ligação de linfócitos T. Relevante é o fato de que esses determinantes antigênicos podem ser originados de qualquer parte do antígeno original e um corolário disto é que linfócitos

T e B podem interagir com epítomos totalmente diferentes e, ainda assim, demonstrar especificidade para o mesmo antígeno (Brostoff e Male, 1994; Reeves e Todd, 2000).

É importante ressaltar que todos os tipos celulares acima citados também têm, como função, a liberação de citocinas, as quais estimulam e amplificam a resposta ou a suprimem quando o agente for totalmente erradicado.

Dessa forma, a ativação e o desempenho de funções pelos linfócitos T e B requerem sua interação, assim como com outros tipos celulares. Como já visto, as oportunidades para que esses contatos ocorram são maximizadas pela recirculação dos linfócitos através de todo o organismo e pela sua manutenção nos órgãos linfóides secundários, levando ao desenvolvimento do vasto repertório imunológico observado em indivíduos normais (Reeves e Todd, 2000)

Os eventos celulares que decorrem da ativação de um linfócito são denominados coletivamente de transformação blástica e as células resultantes deste processo são referidas como células efetoras da resposta imunológica. Morfologicamente, são caracterizados como linfoblastos e possuem elevada capacidade proliferativa. Como resultado, observa-se um aumento do número de células, da produção e secreção de citocinas, assim como de expressão de receptores específicos.

As células efetoras, originadas da ativação de linfócitos T CD4, proliferam dando origem a células auxiliares, responsáveis pela propagação da resposta imunológica por meio da produção e secreção de mediadores químicos, as interleucinas (IL). Os linfócitos T CD8, após contato com o antígeno, ativam-se e proliferam, originando células capazes de produzir grandes quantidades de citocinas, que são secretadas objetivando a eliminação do agente agressor.

No caso de linfócitos B, após transformação, muitos proliferam dando origem aos plasmócitos, células efetoras especializadas na síntese de imunoglobulinas que são, então, secretadas como anticorpos livres, como já citado anteriormente.

Outros linfoblastos formam uma população de memória específica para o antígeno que induziu a resposta primária, readquirindo o aspecto morfológico do linfócito inicial. São essas células que, quando re-expostas ao mesmo antígeno ou a outro cuja estrutura antigênica seja muito semelhante, produzem uma rápida e vigorosa resposta imunológica, chamada secundária (Reeves e Todd, 2000).

A ativação de linfócitos decorre da interação entre um antígeno e o receptor presente na superfície celular com o qual ele pode interagir. Em células CD4, por exemplo, este evento culmina com a proliferação, diferenciação e produção de citocinas que medeiam as funções específicas de células T efectoras, como já citado. Eventos subseqüentes, que ocorrem em segundos ou minutos após a interação ligante-receptor, incluem mudanças no fluxo de cátions monovalentes ( $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ) e a ativação de metiltransferases. Ao mesmo tempo, síntese e utilização de fosfolipídeos aumentam, envolvendo fosfatidilinositol, um constituinte dos fosfolipídeos de membrana. Influxo de  $\text{Ca}^{++}$  é central na ativação de linfócitos e ocorre em poucos minutos após interação do mitógeno fitohemaglutinina, por exemplo, com receptores presentes na superfície de linfócitos humanos. Após algumas horas dessa interação ligante-receptor, a síntese de proteínas aumenta, alcançando um pico entre 48 e 72 horas. Neste período, ocorre aumento da síntese de RNA, assim como há síntese de várias proteínas (Cooper, 1972). O conteúdo de RNA em linfócitos dobra em 48 horas e reflete-se em alterações morfológicas distintas da célula. Finalmente, aumento da síntese de DNA, a marca registrada da proliferação celular, inicia-se após cerca de 36 horas, atingindo níveis máximos entre 48 e 72 horas (Greaves e Janossy, 1972).

Para que a proliferação celular ocorra, fatores de transcrição, que são ativados simultaneamente à interação ligante-receptor, representam intermediários essenciais, os quais transduzem e direcionam sinais extracelulares em respostas transcricionais específicas. A regulação combinada da transcrição envolve complexos multiprotéicos que se ligam de forma cooperativa a regiões específicas do DNA alvo. Esta interação permite a convergência de diferentes sinais para uma região definida do DNA, a qual, por sua vez, exerce controle regulatório rigoroso sobre a expressão dos genes alvos em resposta aos sinais recebidos.

Neste contexto, complexos formados por fatores de transcrição da família NFATc (fator nuclear de células T ativadas), por exemplo, junto com proteínas AP-1 (ativador de proteína 1) e ras, integram vias de sinalização dependentes de  $\text{Ca}^{++}$ , as quais regulam a expressão de genes que codificam proteínas imunomodulatórias como IL2, IL4, IL3/GM-CSF, TNF- $\alpha$ , CD40 e Faz (Feske et al., 2000; Rao et al., 1997; Trama et al., 2000).

A replicação de linfócitos T é muito particular e é determinada pela interação de IL2 com seus receptores (IL2-R) em níveis significativos para desencadear esta ação. Entretanto, células T não expressam IL2-R ao menos que sejam estimulados por antígenos, anticorpos monoclonais específicos para células T, lectinas mitogênicas ou forbol éster, por exemplo. Além disso, uma vez exposta a esses agentes, cada célula T expressa IL2-R de forma individual, entrando em fases proliferativas do ciclo celular de forma assíncrona. Se níveis de IL2 não se mantiverem contínuos, a expressão de IL2-R se mantém, mas a síntese de DNA não ocorre, uma vez que é a interação com IL2-R o fenômeno crucial para que ocorra a replicação do DNA (Cantrell e Smith, 1984).

Um outro ponto de relevância é que a expressão de IL2-R é dependente da presença de antígeno e a retirada do estímulo do meio leva à queda progressiva de seus níveis. Em paralelo, há o declínio, também progressivo, da proliferação celular e todas as células, eventualmente, passam a se apresentar na fase  $G_0$  do ciclo celular, mesmo na presença de concentrações saturantes de IL2 (Smith e Cantrell, 1985).

Certas substâncias possuem a habilidade de ativar e, subsequentemente, induzir a proliferação de linfócitos T, B ou de ambos *in vitro*, sendo genericamente denominados mitógenos (Gery et al., 1972; Gery e Waksman, 1972; Jannosy e Greaves, 1972; Oppenheim e Rosenstreich, 1976). A Tabela 2 mostra uma seleção dessas substâncias e sua especificidade com referência à população estimulada.

Enquanto a resposta a antígenos dos linfócitos *in vivo* é específica, gerando amplificação clonal, sua resposta a mitógenos *in vitro* é inespecífica e influencia, simultaneamente, um grande número de células, levando-as a sofrer transformação blástica e, posteriormente, proliferar.

Diferente do que acontece *in vivo*, esse estímulo à proliferação não depende de células apresentadoras de antígenos, embora os mesmos mecanismos bioquímicos estejam aparentemente envolvidos (Burgermeister et al., 2003). Esta propriedade favorece estudos experimentais e Fitohemaglutinina (PHA) e Concanavalina A (Con A), lectinas extraídas e purificadas de plantas (Tabela 2) que estimulam sub-populações de células T, têm sido usadas como mitógenos para estudos de proliferação dessas populações *in vitro* e a resposta resultante pode ser



utilizada para qualificar e quantificar a imunocompetência dessas células (Myers, 1995).

**Tabela 2.** Mitógenos: suas características e células alvo.

MITÓGENO	FONTE	TAMANHO MOLECULAR (D)	CÉLULAS ALVO	ESPÉCIE(S)
<b>Concanavalina A (ConA)</b>	<i>Canavalia ensiformis</i>	55.000	Linfócitos T	Humana Camundongo
<b>Fitohemaglutinina (PHA)</b>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	140.000	Linfócitos T	Humana Camundongo
<b><i>Pokeweed mitogen</i> (PWM)</b>	<i>Phytolacca americana</i>	32.000	Linfócitos T e B	Humana Camundongo
<b>Lipopolissacarídeo (LPS)</b>	Bactérias gram negativas	1-24x10 <sup>6</sup>	Linfócitos B	Roedores
<b>Dextran sulfato</b>	-	500.000	Linfócitos B	-

Adaptado de(Myers, 1995).

Como já visto, o primeiro passo para a ativação de um linfócito reside na interação de receptores de superfície com um agente estimulante. A interação de um mitógeno com o receptor das células T (TcR), por exemplo, também inicia, na célula, eventos que envolvem o recrutamento de Ca<sup>++</sup> e a ativação simultânea das enzimas tirosina quinases citossólicas fosfolipase C<sub>γ</sub> e A<sub>2</sub>, proteína C quinase (PKC), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e calcineurina. Estas, por via de cascatas metabólicas específicas, produzem sinais direcionados ao núcleo, promovendo a transcrição de fatores pró-mitóticos, tais como NFκB, AP-1 e NFAT. Estes, por sua vez, conduzem os eventos da proliferação e a síntese de IL2, a qual é o principal mediador químico da amplificação da resposta imunológica.

#### *1.3.4 Tipos celulares envolvidos nos mecanismos de defesa imunológica mediados por células*

Os linfócitos são as principais células responsáveis pela resposta imunológica adaptativa. No ser humano, as células da linhagem linfóide originam-se a partir das mesmas células-tronco hematopoiéticas residentes na medula óssea que dão origem aos monócitos, granulócitos, eritrócitos e plaquetas presentes, subsequente durante a ontogenia, no saco vitelino, fígado e medula óssea (Lee et al., 1999). Nos indivíduos adultos, são continuamente produzidos às custas da proliferação controlada das células linfóides primitivas presentes na medula óssea e no timo, as quais dão origem a populações distintas de linfócitos. Antes de se tornarem células maduras e capazes de exercer funções específicas, os linfócitos passam por processos sucessivos para aquisição de imunocompetência no timo ou na própria medula óssea, denominados órgãos linfóides primários. Os que requerem um período de diferenciação no timo são denominados linfócitos T. Outros que continuam a diferenciar no próprio sítio produtor emergem como linfócitos B.

Mais de 70% dos linfócitos circulantes são representados pela linhagem T, os quais participam ativamente na defesa do organismo contra infecções causadas por agentes intracelulares. Enquanto estão no timo, os linfócitos T em desenvolvimento (ou timócitos) apresentam o marcador CD3 e diferenciam-se em duas linhagens, expressando receptores de membrana distintos, relacionadas com as suas funções efectoras, destacando-se as glicoproteínas CD4 e CD8 (Parham, 2001).

Como é no tecido linfóide periférico que ocorrem as maiores chances dos linfócitos T encontrarem antígenos, após a fase de amadurecimento no timo, essas células, agora imunocompetentes, ficam circulando entre a corrente sangüínea e o tecido linfóide periférico até encontrarem o seu antígeno específico, quando, então, são induzidas a proliferar e se diferenciar em células T efectoras (Janeway, 2002). Fazem parte do tecido linfóide periférico, também chamado secundário, os linfonodos, a polpa branca do baço, o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) e o tecido linfóide associado a mucosas (MALT), representado pelas amídalas, placas de Peyer, apêndice, tecidos brônquico e mamário.

O encontro com um antígeno específico provoca a fase final do desenvolvimento e diferenciação dos linfócitos T, onde as células CD8 tornam-se

células T citotóxicas para as células que expressam esses antígenos protéicos, enquanto as células CD4, sob influência de citocinas, tornam-se células T auxiliares subtipos 1 ou 2 (Th1 e Th2, respectivamente), sendo que o tipo celular que predominará depende do patógeno e do tipo de resposta imunológica requerida (Parham, 2001).

Em contraste com o processo de amadurecimento dos linfócitos T, os precursores dos linfócitos B são induzidos a diferenciar dentro da própria medula óssea, influenciados por várias citocinas produzidas pelas células estromais. Os eventos principais envolvem as populações celulares denominadas pró-B e pré-B, as quais centralizam elementos genéticos que codificam receptores específicos para células B, os quais são imunoglobulinas (Igs) especializadas expressas na superfície celular. Igs são moléculas heterodiméricas consistindo de cadeias pesadas (H) e leves (L), ambas contendo regiões variáveis (V) que contribuem na interação com o antígeno e que diferem na sequência de aminoácidos. Em adição, as cadeias L e H contêm regiões que são constantes (C). Todas essas cadeias contribuem para a diversidade de Igs produzidas quando linfócitos B encontram-se com um antígeno (Paul, 2003).

No sangue periférico, os linfócitos B representam de 5 a 15% da população de linfócitos circulantes. Enquanto sua ativação por antígenos protéicos requer a presença de linfócitos T, a qual é facilitada pela expressão de moléculas classe II do sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*), antígenos de natureza lipídica, glicolipídica ou constituídos de proteínas polimerizadas ou carboidratos estimulam células B diretamente.

Macrófagos fazem parte do sistema fagocitário mononuclear que se constitui de células de origem medular, incluindo os monócitos que trafegam no sangue periférico e os macrófagos tissulares. Dependendo do tecido ou órgão onde se encontram, recebem diferentes nomes, como células de Kupffer do fígado, histiócitos nos linfonodos, os macrófagos alveolares e os esplênicos, quando nos pulmões e no baço, respectivamente.

De forma semelhante aos linfócitos, todos têm sua origem em um precursor comum residente na medula óssea, que dá origem aos monócitos do sangue periférico. Da circulação, os monócitos migram para os tecidos, onde se transformam em macrófagos, células com elevada capacidade fagocitária,

responsáveis pela remoção de restos celulares e materiais estranhos particulados (Reeves e Todd, 2000).

Os macrófagos podem ser ativados, processo este que culmina com aumento do seu tamanho, elevação dos níveis de enzimas lisossomais, metabolismo ativo e grande habilidade de fagocitar e eliminar microorganismos. Sua ativação pode ser efetivada por meio de toxinas bacterianas, moléculas de adesão, citocinas secretadas por linfóchetos T ativados e outros mediadores químicos presentes nas reações inflamatórias (Lee et al., 2003; Scott et al., 2003).

Após ativação, como elementos celulares centrais da inflamação crônica, os macrófagos passam a sintetizar e secretar várias moléculas biologicamente ativas, coletivamente chamadas citocinas, que são importantes mediadores das respostas inflamatória e imunológica (Homolka et al., 2003). Particularmente importantes são as citocinas produzidas que têm a habilidade de ativar linfócitos, os quais passam também a secretar mediadores, fechando e amplificando um círculo de respostas biológicas responsáveis não só pela eliminação de agentes invasores, mas também envolvidas nos processos para garantir o restabelecimento do organismo e desenvolver resistência.

Como células apresentadoras de antígenos (APC), os macrófagos têm a capacidade de reconhecer e, subsequente, internalizar antígenos, processá-los e, posteriormente, expor fragmentos destes para os linfócitos T por meio de moléculas de superfície específicas do MHC (Roitt et al., 2003).

Dessa forma, os macrófagos desempenham funções centrais na resposta imunológica, assim como o fazem na resposta inflamatória. Primeiro, eles são necessários para processar e apresentar antígenos aos linfócitos T imunocompetentes, pois, ao contrário das células B, as células T não são ativadas por antígenos solúveis. Segundo, eles produzem numerosas citocinas, dentre elas a interleucina 1 (IL1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), capazes de amplificar as respostas inflamatórias e imunitária. Também, são elementos capazes de lisar células tumorais pela produção de metabólitos tóxicos e enzimas proteolíticas, sendo importantes na vigilância imunológica (Cotran et al., 1994).

## 1.4 ADESÃO CELULAR

O processo de adesão ocorre em vários eventos biológicos, sendo essencial durante a morfogênese, no crescimento, na organização e estabilidade teciduais, na inflamação, na resposta do hospedeiro às infecções e injúrias e, nos processos de cicatrização, dentre outros.

Além da resposta inflamatória, a capacidade adesiva dos leucócitos interfere com inúmeras funções dos mesmos, como a citotoxicidade de linfócitos T, síntese de imunoglobulinas por linfócitos B, fagocitose e quimiotaxia por granulócitos e macrófagos, e a permanências destas células nos órgãos linfóides (Arnaout, 1990b; Carlos e Harlan, 1994; Gahmberg et al., 1999; Springer, 1990).

Os eventos de adesão, rolamento, transmigração e retenção dos leucócitos em processos inflamatórios são dependentes da interação entre receptores e ligantes presentes nos leucócitos, nas células endoteliais e na própria MEC (Springer, 1994).

Uma função crítica da inflamação é, pois, a adesão dos leucócitos ao endotélio, permitindo sua passagem do sangue periférico para o tecido conjuntivo no qual se situa o foco inflamatório. Uma vez que os leucócitos tenham atravessado a barreira de células endoteliais, inúmeros passos envolvendo a adesão celular permitem a retenção destas células no sítio inflamatório. Esta parte do processo de recrutamento também depende da interação das moléculas de adesão dos leucócitos com algumas moléculas da MEC, como colágeno, lamininas, proteoglicanos, FN e VN. Devido ao aumento da permeabilidade da camada endotelial durante o processo inflamatório, também se acumulam, no sítio inflamatório, uma série de proteínas plasmáticas como a fibronectina (FN) e a vitronectina (VN), que também participam como substratos para ligação de leucócitos (Gailit e Clark, 1994).

## 1.5 MOLÉCULAS DE ADESÃO

As moléculas de adesão, como já citado, são glicoproteínas que medeiam o contato entre duas células ou entre a célula e a MEC, sendo responsáveis pela adesão intercelular, adesão celular ao epitélio e ao endotélio, recrutamento e migração seletiva de células inflamatórias dos vasos sangüíneos até o local da

inflamação. Atuam, ainda, como moléculas sinalizadoras, tendo participação essencial na regulação da inflamação e da resposta imunitária (Simmons, 1995).

Dependendo de suas características moleculares, as moléculas de adesão estão agrupadas em quatro superfamílias: a das imunoglobulinas, a das selectinas, a das integrinas e as caderinas (Simmons, 1995). Na superfamília das imunoglobulinas estão incluídas, dentre outras, as moléculas expressas no endotélio vascular, importantes na interação leucócito-endotélio, como a VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule - 1*) e a ICAM-1 (*Intercellular Cell Adhesion Molecule - 1*) (Simmons, 1995).

A ICAM-1 é constitutivamente expressa no epitélio e, em baixos níveis, nas células endoteliais, tendo sua transcrição regulada por várias citocinas. Possui dois sítios de ligação para a integrina  $\alpha_L\beta_2$ , também conhecida como CD11a e LFA-1 (*Lymphocyte Function Antigen - 1*). A VCAM-1 tem níveis de expressão basal muito baixos nas células endoteliais, porém esses níveis aumentam sob ação de citocinas como a IL-4. Sua fixação maior ocorre através do ligante  $\alpha_4\beta_1$ , também conhecido como VLA-4 (*Very Late Activation Antigen - 4*) (Carlos e Harlan, 1994; Gahmberg et al., 1999). Enquanto, ICAM-1 está envolvida no recrutamento de todos os tipos de leucócitos, VCAM-1 mobiliza células mediadoras da inflamação crônica como linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos (Springer, 1994).

As moléculas de adesão pertencentes à família das seletinas são expressas em células endoteliais (E-seletina), plaquetas (P-seletina) e leucócitos (L-seletina) e medeiam os processos envolvidos no rolamento dos leucócitos ao longo da parede do vaso (Lawrence e Springer, 1991), enquanto as da família das integrinas promovem a adesão transitória dessas células ao endotélio (Springer, 1990).

### 1.5.1 Integrinas

As integrinas caracterizam-se como uma família com mais de 20 receptores transmembrânicos diferentes, formados por associações não-covalentes das subunidades heterodiméricas  $\alpha$  e  $\beta$ , ambas cooperando para a formação de domínios usados para acoplamento (Hynes, 1987; Hynes, 1992) por uma ampla variedade de células, sendo que a maioria das células expressa alguma integrina.

São conhecidas, até o momento, pelo menos oito subunidades  $\beta$ , com aproximadamente 750 resíduos de comprimento, e 14 subunidades  $\alpha$ , com cerca de 1000 resíduos, todas de natureza glicoprotéica e cada uma com um segmento extracelular transmembrânico hidrofóbico único (Hynes, 1992), e uma pequena porção citoplasmática. Enquanto o domínio extracelular interage com uma série de ligantes, incluindo proteínas da MEC, como FN, VN, colágeno e outros receptores celulares como as ICAM-1 e VCAM-1 (Arnaout, 1990a; Burridge et al., 1988; Springer, 1990), a porção citoplasmática interage com as proteínas do citoesqueleto celular (Meredith et al., 1996) por meio da porção  $\beta$ .

Como regra geral, as integrinas que contêm a subunidade  $\beta_1$  medeiam interações com componentes da MEC (Akiyama et al., 1990; Buck e Horwitz, 1987), enquanto as  $\beta_2$ , expressas unicamente nos leucócitos juntamente com três unidades  $\alpha$ , também específicas para leucócitos, medeiam interações intercelulares (Wright e Detmers, 1988).

Deve-se ressaltar que cada receptor  $\alpha\beta$  reconhece um ou mais ligantes e a especificidade de ligação de um determinado receptor pode ser marcadamente comprometida pelo ambiente em que ele se encontra ou pelo seu estado de ativação. Dessa forma, a expressão de uma integrina não necessariamente indica que ela terá um papel funcional na adesão, até mesmo se o seu ligante estiver presente em um contexto disponível. Muitas vezes, elas precisam ser primeiro ativadas por mediadores solúveis, como hormônios e particularmente citocinas, por exemplo, ou por proteínas componentes da MEC (Hynes, 1992; Lampugnani e Dejana, 1997; Springer, 1990) para, então, aumentar sua afinidade e interagir com o ligante.

Neste contexto, o domínio da FN que interage com as integrinas, a região RGD, também descrita para a VN, é responsável pelo acoplamento destas às integrinas  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  e  $\alpha_v\beta$ , sendo que a sequência ácido glutâmico-isoleucina-leucina-asparagina-valina (EILDV) da FN, interage especificamente com a integrina  $\alpha_4\beta_1$ , enquanto asparagina-glicina-ácido glutâmico-alanina (DGEA) acopla-se à integrina  $\alpha_2\beta_1$  (Doherty et al., 1990).

As integrinas  $\beta_2$  são estruturas heterodímeras que contêm uma cadeia  $\alpha$  variável (CD11a, CD11b ou CD11c) e uma cadeia  $\beta$  comum (CD18) (Arnaout,

1990a). A molécula  $\alpha_L\beta_2$  é uma integrina expressa em todos os leucócitos (Hynes, 1992; Kipps, 2001), sendo constitutivamente ativa em diferentes células (Larson et al., 1991). Esta integrina não se adere normalmente ao seu ligante ICAM-1, presente no endotélio vascular (Hynes, 1992). Entretanto, quando os granulócitos são ativados por diferentes fatores, em particular os que estimulam sua migração, como a IL8 (Ben-Baruch et al., 1995),  $\alpha_L\beta_2$  é convertida de um estado de baixa afinidade para uma situação de alta afinidade para com ICAM-1, com mudança conformacional da molécula (Hynes, 1992).

Durante uma inflamação, por exemplo, o aumento da afinidade de  $\alpha_L\beta_2$  simultaneamente ao aumento da expressão de ICAM-1 pelo endotélio induzido por citocinas, propicia-lhes uma forte ligação. Esta interação, juntamente com a diminuição do fluxo sanguíneo local, permite uma firme adesão dessas células ao endotélio, facilitando processos subseqüentes como, por exemplo, a transmigração celular e a quimiotaxia (Hynes, 1992).

Integrinas  $\beta_1$  são encontradas primariamente em leucócitos presentes na inflamação crônica e seus níveis aumentam após estímulo antigênico. Assim como em outros tipos de células, as integrinas  $\beta_1$  medeiam adesão de linfócitos às proteínas da matriz extracelular e parecem desempenhar função relevante no extravasamento e migração dessas células ativadas nos tecidos durante a resposta imunitária (Ferguson et al., 1991).

Dentre as integrinas  $\beta_1$ , destacam-se as moléculas VLA (*Very Late Activation antigens*), cuja terminologia está relacionada a um grupo de moléculas, cujos níveis de expressão elevam-se em linfócitos somente 14-21 dias após sua ativação (Clark et al., 1992). Ocorrem em, pelo menos, seis diferentes isoformas, denominadas VLA-1 a VLA-6.

Dentre elas, a VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$  ou CD49d/CD29), é uma integrina  $\beta_1$  que atua como receptor celular (Springer, 1994) ligando-se, via EILDV, à VCAM-1 (Shimizu et al., 1990a) e, como receptor de matriz, liga-se ao mesmo sítio de ligação presente na molécula de FN. Da mesma forma, VLA-5, denominado também de  $\alpha_5\beta_1$  e CD49e, interage com a FN usando o sítio RGD.

Observou-se que a ativação aguda de células que medeiam as respostas inflamatória e imunitária resulta em uma rápida indução da sua adesão à



fibronectina, porém sem alteração dos níveis de expressão de  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_5\beta_1$  (Shimizu et al., 1990b).

Em adição ao seu papel como receptores da adesão, as integrinas também atuam como sinalizadores para outros receptores e parecem estar envolvidas com a regulação do reconhecimento do citoesqueleto, transporte iônico, metabolismo de lipídios, ativação de proteínas quinase e expressão gênica (Meredith et al., 1996).

## 1.6 PRODUTOS NATURAIS EXTRAÍDOS DE PLANTAS MEDICINAIS COMO AGENTES TERAPÊUTICOS

Produtos extraídos de plantas medicinais continuam a representar uma diversidade química única, a qual continuará a ser uma fonte importante de compostos-modelo para programas de investigação clínica, iniciados a partir da observação das espécies de plantas regionais popularmente utilizadas.

De acordo com estudos de Willianson e colaboradores, estima-se que o planeta Terra possua entre 370.000 e 500.000 vegetais superiores que elaboram metabólitos secundários com potencial interesse medicinal (Willianson et al., 1996). No Brasil, diante de uma flora tão rica e diversificada, a utilização de plantas como medicamentos caseiros é ampla, tornando imperativo, para o país, a criação de uma política de incentivo à investigação científica das potencialidades terapêuticas desta fonte alternativa de medicamento.

Hoje, as companhias farmacêuticas empregam cerca de US\$350 milhões para desenvolver uma nova droga e procedimentos para melhorar e acelerar o descobrimento destas são requeridos (Grabley e Thiericke, 1999). Ao mesmo tempo, estas investigações têm ajudado no entendimento das doenças em níveis molecular e genético. Subseqüentemente, a automação e a miniaturização vêm tomando espaço na área, mudando drasticamente o processo industrial no descobrimento de drogas (Schraml et al., 2003). Além disso, a elucidação do genoma humano vem facilitando o acesso a um aumento expressivo do número de potenciais alvos de drogas (Grabley e Thiericke, 1999; Norman, 1998).

A diversidade de atividades biológicas apresentadas por plantas usadas na medicina caseira vem sendo investigada e o espectro dessas ações amplifica na mesma proporção em que metodologias mais específicas vão se consolidando

cientificamente. Vários modelos experimentais, *in vivo* e *in vitro*, estão hoje disponíveis para tal investigação. De particular interesse são aqueles direcionados ao estudo das atividades terapêuticas associadas ao câncer (Hirazumi et al., 1996) e doenças infecciosas (Zarkovic et al., 2001).

Devido ao potencial biológico descrito para vários alcalóides indólicos e as indicações que a uleína parece ter, dotada de atividades que podem interferir com as respostas de defesa do organismo humano, investigou-se, neste trabalho, sua ação sobre algumas etapas importantes das respostas inflamatória e imunitária em modelos *in vitro*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

- Investigação de atividades biológicas do alcalóide uleína, extraído e purificado de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da uleína sobre a capacidade de adesão a fibronectina imobilizada de diferentes populações de leucócitos humanos;

- Avaliar o efeito da uleína sobre a capacidade de adesão à vitronectina imobilizada de diferentes populações de leucócitos humanos;

- Avaliar a presença das interginas  $\alpha_L\beta_2$ ,  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_5\beta_1$  na superfície celular de leucócitos humanos obtidos de sangue periférico, antes e após exposição ao alcalóide uleína;

- Avaliar o potencial imunomodulatório da uleína sobre a transformação blástica e a proliferação de linfócitos humanos por citometria de fluxo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CASUÍSTICA

Foram incluídos neste estudo indivíduos considerados sadios por não apresentarem sinais ou sintomas de doença, nem estarem fazendo uso de medicamentos por ocasião da doação, cujo consentimento livre e esclarecido foi obtido após aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, registro CEP/SD 039.51.003/04-01, aprovado em abril de 2004.

#### 3.2 COMPOSIÇÃO DE SOLUÇÕES E TAMPÕES

Os sais e reagentes utilizados neste trabalho são de procedência Merck ou Sigma, salvo indicação contrária. Para o preparo das soluções, utilizou-se água pura obtida pelo sistema Puritech / Permution. As soluções foram preparadas e, em seguida, esterilizadas (1) por calor úmido (autoclavação a 121°C, 30min, 1atm) ou (2) por filtração (0,22µm – Acrodisc) e, posteriormente, armazenadas em temperaturas apropriadas para sua conservação (temperatura ambiente, a 4 - 8°C ou a -20°C), ao abrigo de luz, conforme indicado.

- *Solução salina tamponada com fosfatos (PBS)*: a solução tampão foi preparada dissolvendo-se  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (150mmol/l),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (150mmol/l) e  $\text{NaCl}$  (154mmol/l) em água. Após ajuste do pH para 7,2 – 7,4 com solução de  $\text{NaOH}$  1M, procedeu-se a esterilização por autoclavação e armazenamento a 4 – 8°C.

- *PBS suplementado com albumina sorobovina (BSA)*: PBS foi suplementado, em condições assépticas, no momento do uso, com BSA 1% (p/v).

- *Solução hemolisante de Gey*

- \* Solução A:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (654,20mmol/l),  $\text{KCl}$  (24,83mmol/l),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (6,53mmol/l),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,88mmol/l), glucose (27,77mmol/l), vermelho de fenol (0,05g/l)
- \* Solução B:  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2,06mmol/l),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,56mmol/l),  $\text{CaCl}_2$  (3,42mmol/l)
- \* Solução C:  $\text{NaHCO}_3$  (26,78mmol/l)

O pH de cada solução foi ajustado para 7,2 – 7,4 com solução de NaOH 1M e os reagentes foram conservados a 4°C. No momento do uso, a solução hemolisante foi preparada na proporção de 4:1:1:14 para as soluções A, B, C e água, respectivamente.

- *Solução de tripsina a 0,025%*: solução de tripsina foi preparada, em condições estéreis, diluindo-se o reagente *Trypsin – EDTA 0,05%* (Gibco) na proporção de 1:2 em PBS e conservada a –20°C.

- *Meio RPMI 1640*: RPMI 1640 (Gibco) em pó foi dissolvido em água conforme instruções do fabricante e suplementado com 3g/l de bicarbonato de sódio. O meio foi, então, esterilizado por filtração usando-se o sistema a vácuo Sterifil (Millipore).

- *Meio RPMI 1640 suplementado*: meio RPMI 1640 foi suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal em condições assépticas.

- *Sepharose 4B ativada por CNBr* (Amersham Biosciences): a resina foi ressuspensa em HCl 1mM na proporção de 200ml/g de resina. Um grama de resina fornece 3,5ml de coluna.

- *Tampão de acoplamento a Sepharose 4B*: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M, pH 8,0, acrescido de 5mg de gelatina/ml de Sepharose.

- *Solução de bloqueio*: glicina 0,2M em água, pH 8,0.

- *Soluções de lavagem da coluna Sepharose 4B*:

- \* 1- Acetato de sódio 0,1M, NaCl 0,5M, pH 4,0
- \* 2 - Uréia 2M, suplementado de NaCl 0,5M
- \* 3 - Glicina 0,4M, pH 2,0
- \* 4 - Água
- \* 5 - PBS, pH 7,3, suplementado com 0,02% de ázida sódica.

- *Solução de preparo da coluna Sepharose 4B para adsorção da fibronectina*: tampão Tris<sup>#</sup>-HCl 50mM, pH 7,3.

---

<sup>#</sup> Tris(hidroximetil)metilamina

- *Solução de eluição da fibronectina*: Tris-HCl 50mM, suplementado com uréia 2M, pH 7,3.
- *Sepharose-Heparina CL-6B* (Pharmacia): a resina foi ressuspensa em água na proporção de 200ml/g de resina. Um grama de resina fornece 5ml de coluna.
- *Soluções de lavagem da coluna Heparina-Sepharose CL-6B*: Tampão P-Na 10mM:  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  (10mM) e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (10mM) foram dissolvidos em água e, quando necessário, suplementou-se com NaCl 2M e EDTA 5mM, pH 7,7 (tampão P-Na 1) ou com NaCl 0,13M e EDTA 5mM, pH 7,7 (tampão P-Na 2).
- *Solução desnaturante da vitronectina*: uréia 8M.
- *Solução de lavagem para ligantes inespecíficos 1*: tampão P-Na 1, suplementado com uréia 8M e  $\beta$ -mercaptoetanol 10 $\mu$ M.
- *Solução de lavagem A* (tampão A): EDTA 5mM, uréia 8M e tampão P-Na 10mM.
- *Solução de lavagem B*: tampão A, suplementado com NaCl 0,13M.
- *Solução de lavagem para ligantes inespecíficos 2*: tampão A, suplementado com  $\beta$ -mercaptoetanol 10 $\mu$ M e NaCl 0,13M.
- *Solução de eluição da vitronectina*: tampão A, suplementado com NaCl 0,5M.
- *Solução de acrilamida 30%*: acrilamida 29,2% e N'N'bis-metileno-acrilamida 0,8% foram dissolvidos em água e a solução conservada a 4°C.
- *Tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8 e Tampão Tris-HCl 1M pH 8,8*: Tris-base foi dissolvido em água na molaridade requerida e o pH foi ajustado com solução de HCl 6N, sendo as soluções armazenadas a 4°C.
- *Gel de poliacrilamida 6%* (gel de corrida):
 

* solução de acrilamida 30%	2,0ml
* Tris-HCl 1,5M, pH 8,8	2,5ml
* SDS 10%	0,1ml
* Persulfato de amônia 10%	0,1ml

* TEMED <sup>#</sup>	0,024ml
* Água q.s.p.	10ml

- *Gel de poliacrilamida 5% (gel de alinhamento):*

* solução de acrilamida 30%	0,33ml
* Tris-HCl 1,5M, pH 8,8	0,25ml
* SDS 10%	0,02ml
* Persulfato de amônia 10%	0,02ml
* TEMED	0,006ml
* Água q.s.p.	2ml

- *Tampão de carregamento de amostra:* Tris-HCl 100mM pH 8,8, azul de bromofenol 0,05% (p/v), glicerol 20% (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 10% (v/v) e SDS 2% (p/v), utilizado na proporção de 1:4 em relação à amostra.

- *Tampão de corrida em condições desnaturantes:* Tris-HCl 3,03% (p/v), glicina 14,4% (p/v), SDS 0,1% (p/v).

- *Solução corante de gel de poliacrilamida:* Azul Brilhante de Comassie R-250 0,05% (p/v) foi dissolvido em metanol (50%) e adicionado de ácido acético (10%) e água (40%). A solução foi mantida em temperatura ambiente.

- *Solução descorante de gel de poliacrilamida:* metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) em água.

- *Tampão de transferência:* Tris-HCl 3,03% (p/v), glicina 1,44% (p/v), metanol 20% e SDS 0,1% (p/v).

- *Solução corante de membrana de nitrocelulose:* Ponceau-S 0,2% (p/v) e ácido acético 3% (v/v).

- *Solução de TBST 0,05%:* NaCl 120mM, Tris-HCl 20mM, pH 7,4 e Tween 20 0,05% (v/v).

- *Solução de bloqueio da membrana de nitrocelulose:* leite desnatado (Nestlé) 5% (p/v) em PBS, contendo TBST 0,05% (v/v).

---

<sup>#</sup> N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina

### 3.3 OBTENÇÃO DOS LEUCÓCITOS

Amostras de sangue periférico de indivíduos voluntários sadios colhidas em seringas estéreis e anticoagulados com heparina foram utilizadas para obtenção das diferentes populações de leucócitos humanos. Células mononucleares (MNC: linfócitos e monócitos) foram separadas dos granulócitos (GRN: neutrófilos, eosinófilos e basófilos) por meio de centrifugação usando-se Ficoll-Paque<sup>TM</sup>PLUS (Amersham, Biosciences) 1,077g/cm<sup>3</sup> como gradiente de densidade. Após centrifugação a 200g por dez minutos em temperatura ambiente, foi retirado o plasma rico em plaquetas, sendo o volume reconstituído com PBS. Nova centrifugação a 800g por 25 minutos permitiu a separação do creme leucocitário ( $\pm 2$ ml), que foi adicionado de PBS ( $\pm 9$ ml) e gentilmente depositado sobre o gradiente de densidade (3 ml). Após centrifugação (200g por trinta minutos em temperatura ambiente), os MNC recuperados da interface do gradiente foram lavados duas vezes com PBS (800g/5min), ressuspensos em RPMI 1640 e a concentração ajustada para 10<sup>6</sup> células/ml com auxílio de hemocítmetro. Os granulócitos, recuperados do sedimento após lise dos eritrócitos com solução hemolisante de Gey, foram lavados duas vezes com PBS (800g/5min), ressuspensos em RPMI 1640, enumerados com auxílio de um hemocítmetro e sua concentração igualmente ajustada para 10<sup>6</sup> células/ml.

### 3.4 PREPARO DE CITOCENTRIFUGADOS

Para observar a composição das frações de MNC e de GNC, citocentrifugados contendo 4x10<sup>4</sup> células foram preparados após centrifugação a 1500rpm por cinco minutos, sob baixa aceleração, em citocentrífuga Cytopro<sup>TM</sup> (Wescor). Em seguida, foram corados com May-Grünwald-Giemsa e observados sob microscopia de luz. Fotografias foram obtidas usando-se o *software* IMAGE PRO PLUS acoplado ao microscópio Olympus CH30.

### 3.5 COLORAÇÃO DE MAY-GRUNWALD-GIEMSA

Citocentrifugados secos ao ar foram recobertos pelo corante May-Grunwald por três minutos; o corante foi, então, diluído com gotas de água destilada tamponada pH 6,8, por um minuto; em seguida, adicionou-se o corante de Giemsa



diluído em água tamponada (1:20) e incubou-se por quinze minutos. Finalmente, as lâminas foram lavadas em água corrente e secas ao ar.

### 3.6 VIABILIDADE E CITOTOXICIDADE CELULARES

A viabilidade dos leucócitos foi avaliada após o processo de isolamento e durante todas as etapas dos procedimentos metodológicos. Para tanto, usou-se o teste com azul de tripano. Populações de leucócitos isoladas como descrito anteriormente foram diluídas apropriadamente em solução a 0,4% (p/v) de azul de tripano em PBS e sua viabilidade observada ao microscópio de luz (Olympus CH30). Somente amostras contendo  $\geq 90\%$  de células viáveis foram utilizadas nos experimentos. Para avaliação do efeito tóxico da uleína, concentrações crescentes ( $10^{-4}$  -  $10^2$   $\mu\text{g/ml}$ ) do alcalóide foram adicionadas a  $2 \times 10^5$  células e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por duas e três horas para GRN e MNC, além de quatro e cinco dias somente para MNC, em RPMI 1640 suplementado. Em seguida, as células foram observadas quanto à viabilidade como acima descrito.

### 3.7 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE FIBRONECTINA DE PLASMA HUMANO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

#### 3.7.1 *Preparo da coluna de Sepharose-gelatina*

Para a obtenção de fibronectina de plasma humano, utilizou-se o sistema da Amersham Biosciences Sepharose™ 4B ativada com CNBr conjugada a gelatina. A 2,5g de Sepharose 4B (Amersham) juntou-se frações de 50ml de HCl 1mM para hidratação da resina, durante 15 minutos, em temperatura ambiente. Em paralelo, dissolveu-se a gelatina (Sigma G-2500) em tampão fosfato 0,1M pH 8,0, cuja absorvância em 280nm foi de 0,452. Após total remoção da solução de HCl da resina, a qual passou a ter o volume de 8,7ml, adicionou-se 15ml da solução tampão de acoplamento e a mistura foi deixada em constante agitação por 12 horas, a  $4^\circ\text{C}$ . Em seguida, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante lido em 280nm novamente, apresentando 0,306 de leitura, demonstrando acoplamento entre a gelatina e a Sepharose. Após remoção total do sobrenadante, foram adicionados 15ml de solução de glicina 0,2M pH 8,0 e incubado por 16 horas, em constante agitação, a

4°C. Lavou-se a resina consecutivamente com as soluções de lavagem 1, 2, 3, 4 e, finalmente 5, onde a resina ficou armazenada sob refrigeração até uso.

### *3.7.2 Isolamento de fibronectina em coluna de Sepharose-gelatina*

Em coluna 1,0 x 7,0cm de Sepharose-gelatina em PBS, pH 7,3, foram aplicados 300ml de plasma humano 50% (v/v) em Tris 50mM, com 1,2mM de PMSF, os quais ficaram em extração contínua durante dezesseis horas, sob refrigeração (4°C), com auxílio de bomba peristáltica (0,34ml/min). O material adsorvido contendo FN foi eluído em frações de 3ml cada, com solução de uréia 2M em tampão Tris 50mM, pH 7,3.

### *3.7.3 Purificação de fibronectina*

Das 29 frações obtidas, reuniu-se em alíquota única as que demonstraram absorção > 0,3 em 280nm (HITACHI U-2001) e dializou-se em PBS por 12 horas a 4°C usando-se oito unidades de cerca de 10cm cada de membrana de celulose apropriada para diálise (Sigma D-9527, 43mm x 27mm). O volume de PBS usado foi de cerca de 2 litros cada vez, o qual foi trocado após 2, 12 e 18 horas de contato, a 4°C.

### *3.7.4 Quantificação de fibronectina*

O conteúdo em FN resultante da diálise foi quantificado de acordo com Mosesson e Umfleet (1970) como a seguir: em cubeta de quartzo com 1cm, adicionou-se 500µl do eluato e leu-se a concentração em 280nm, sabendo-se que 1mg/ml de FN corresponde à leitura de 1,28 (Mosesson e Umfleet, 1970).

## **3.8 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE VITRONECTINA DE PLASMA HUMANO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE**

### *3.8.1 Preparo da coluna de Sepharose-heparina*

Para obtenção de vitronectina de plasma humano, utilizou-se o sistema *Heparin Sepharose* CL-6B, Pharmacia. Para 2g de resina, adicionou-se 30ml de água e a solução foi transferida para uma coluna de 1,0 x 7,0cm, a qual foi lavada

com água (400ml) por 15 minutos e armazenada sob refrigeração até o momento do uso. Imediatamente antes do uso, a coluna foi lavada com a solução tampão P-Na 1 (50ml) e, em seguida, equilibrada com o tampão P-Na 2.

### *3.8.2 Isolamento de vitronectina em coluna de Sepharose-heparina*

Plasma humano (125ml) foi coagulado com 2,5ml de  $\text{CaCl}_2$  1M por uma hora em temperatura ambiente, seguida de mais duas horas sob refrigeração. Após separação do soro (800/5min), este teve o pH ajustado para pH 7,7 e foi adicionado de 3ml de solução de benzamidina 20mM e 1,25ml de EDTA 0,2M. Em seguida, o soro tratado foi rapidamente passado pela coluna para a retirada de contaminantes inespecíficos, eluído e o volume ajustado para cerca de 300ml com água; adicionou-se ao eluato cristais puros de uréia (Reagen) em quantidade suficiente para a solução final ter 8M, a qual ficou em repouso por duas horas em temperatura ambiente. Em paralelo, a coluna foi lavada com 50ml de solução de lavagem para ligantes inespecíficos 1 e equilibrada com o tampão de lavagem A. O soro reservado foi, então, aplicado à coluna, e a VN extraída continuamente, durante dezesseis horas, a temperatura ambiente, com auxílio de bomba peristáltica (0,34ml/min). Em seguida, a coluna com VN adsorvida foi lavada com o tampão de lavagem A (100ml), seguida de lavagem com o tampão de lavagem B (150ml); após, adicionou-se 5ml de solução de lavagem para ligantes inespecíficos 2; adicionou-se mais 15ml deste tampão e deixou-se em incubação por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, desprezou-se este tampão e adicionou-se mais 45 ml para lavagem final de ligantes inespecíficos. A vitronectina adsorvida foi, então, eluída com solução de lavagem A suplementada com NaCl 0,5M em alíquotas de 3ml cada, resultando em 23 frações.

### *3.8.3 Purificação de vitronectina*

As frações resultantes da extração de vitronectina foram dialisadas em PBS por 12 horas a temperatura ambiente, usando-se membrana de celulose apropriada para diálise (Sigma D-9527, 43mm x 27mm), em oito unidades de cerca de 10cm cada. O volume de PBS usado foi de cerca de 2 litros e trocado após 2, 12 e 18 horas de contato.

#### 3.8.4. Quantificação de vitronectina

O conteúdo em VN resultante foi quantificado de acordo com Dahlback e Podack (1985) como a seguir: em cubeta de quartzo com 1cm, adicionou-se 500 $\mu$ l do eluato e leu-se a concentração em 280nm, sabendo-se que 1mg/ml de VN corresponde à leitura de 1,38 (Dahlback e Podack, 1985).

### 3.9 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE)

Eletroforese do material eluído das colunas Sepharose-gelatina e Sepharose-heparina foi realizada em gel de poliacrilamida 6%, sob corrente constante de 25mA, por uma hora, em temperatura ambiente em cuba específica (BioRad).

### 3.10 COLORAÇÃO DE GEL DE POLIACRILAMIDA

Para a identificação de bandas protéicas, cada gel de poliacrilamida foi corado com solução de Azul Brilhante de Coomassie por 20 minutos à temperatura ambiente, sob agitação constante, e descorados nas mesmas condições da coloração, com sucessivas trocas de solução descorante.

### 3.11 WESTERN BLOT

Após corrida eletroforética em gel de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (BioRad) em cuba Trans-Blot Cell, BioRad, a uma voltagem constante de 25V, não ultrapassando 90mA, por 16 horas a 4°C. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram coradas com solução corante de Ponceau S, para monitorar a transferência. Posteriormente, as membranas foram descoradas com água deionizada e os sítios inespecíficos bloqueados com solução de bloqueio por duas horas. A seguir, as membranas foram incubadas com solução de anticorpos primários obtidos em coelhos imunizados contra fibronectina ou vitronectina humanas (2 $\mu$ g/ml), por dezesseis horas, sob refrigeração e agitação constante. As membranas foram, então, lavadas com solução de bloqueio, três vezes, durante dez minutos cada. Para visualizar a imunorreação, as membranas foram incubadas com solução de

anticorpos anti-IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina por uma hora e, em seguida, lavadas com a solução de bloqueio, três vezes, durante dez minutos cada. A revelação das bandas protéicas foi realizada em câmara escura com a utilização de luminol, revelador apropriado e filmes radiográficos 35x35mm, Kodak.

### 3.12 OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA ULEÍNA

Cascas de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson (15kg) foram adquiridas no mercado formal de plantas medicinais na região metropolitana da cidade de São Paulo, Brasil, e a identificação da espécie foi feita pelo Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, através da análise farmacognóstica, segundo a Farmacopéia Brasileira I (1929) e por comparação macroscópica e microscópica com amostra autêntica. Uma amostra do material botânico utilizado encontra-se depositada no mesmo laboratório, onde permanece como material de referência e estudo. A droga foi moída, desengordurada em soxhlet com éter de petróleo e em seguida submetida à maceração com solução aquosa de ácido clorídrico 1% (v/v) e extraída até reação negativa frente ao reagente de Dragendorff. O extrato obtido foi filtrado e concentrado em rotavapor (40°C) até aproximadamente 1/5 do volume inicial e posteriormente alcalinizado com carbonato de sódio e submetido à partição com clorofórmio. O extrato orgânico foi evaporado sob pressão reduzida, obtendo-se 17,29g da fração rica em alcalóides. Essa fração foi suspensa em solução aquosa de ácido clorídrico 1%, filtrada e concentrada em rota-vapor até secar e os ensaios foram realizados com os alcalóides na forma de cloridrato.

Uma porção da fração de alcalóides pH 10 (3g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel 70-230 mesh (60g) e eluída com um gradiente de *n*-hexano, hexano:tolueno, tolueno, tolueno:DMC, DMC, DMC:CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>:AcOet, AcOet, AcOet:EtOH e EtOH. Desse fracionamento foram obtidas 475 frações, que foram submetidas a CCD (fase móvel: *n*-hexano:AcOet:MeOH:(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N(5:4:0,8:0,2), revelada com reagente de Dragendorff e sulfato cérico amoniacal seguida por aquecimento. Após verificação das CCD, frações com mesmo perfil cromatográfico foram combinadas rendendo 33 frações denominadas U1 até U33. As frações U12-U20 foram novamente reunidas e submetidas a cromatografia preparativa em sílica

gel (20x20cm) rendendo quatro manchas bem definidas, denominadas R1D1, R1D2, R1D3 e R1D4. A fração R1D1 ( $R_f$  0,37), foi resubmetida a cromatografia em sílica gel (10g) usando como solvente  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (99,5:0,5), onde foi obtido 0,2051g (0,0041%) de um composto puro o qual foi submetido a várias recristalizações em  $\text{CHCl}_3$ /MeOH e seco em Abderhalden na presença de  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Investigação química do composto isolado por métodos espectrométricos (UV, IR, EM, RNM) e por comparação com amostra padrão e dados da literatura, indicou tratar-se do composto uleína (Franca, et al., 2000, Joule e Djerassi, 1964, Oshi, et al., 1964).

### 3.13 ADESÃO CELULAR A FIBRONECTINA E A VITRONECTINA IMOBILIZADAS

Para o estudo da função adesiva dos leucócitos, utilizou-se o ensaio de adesão à FN e VN imobilizadas descrito por Durig e colaboradores (Durig et al., 1998), com algumas modificações. Foram adicionados a poços de placas estéreis de 96 cavidades (TPP), fundo chato, 50 $\mu$ l de solução de fibronectina (40 $\mu$ g/ml) ou vitronectina (20 $\mu$ g/ml). Após uma hora de incubação a 37°C, os poços foram lavados duas vezes com PBS. Com a finalidade de se bloquear sítios inespecíficos, adicionou-se 100 $\mu$ l/poço de PBS enriquecido com 1% (p/v) de BSA inativada (56°C por uma hora) e as placas foram re-incubadas por uma hora a 37°C em temperatura ambiente. Finalmente, os poços foram lavados três vezes com PBS. Após a última lavagem, 50 $\mu$ l de meio RPMI 1640 contendo  $2 \times 10^5$  células e 50 $\mu$ l de uleína, nas concentrações de  $10^{-3}$  a 100 $\mu$ g/ml, foram adicionados a cada poço e incubados a 37°C por uma hora. As células que não aderiram à FN ou VN (células não aderentes) foram removidas dos poços por aspiração; em seguida, os poços foram lavados duas vezes com 100 $\mu$ l de PBS, sendo esses volumes adicionados à população inicial. As células aderidas (células aderentes) foram desalojadas após tratamento com solução de tripsina-EDTA, com incubação a 37°C por cerca de dez minutos. A ação proteolítica da tripsina foi inibida por meio de adição de 10 $\mu$ l de soro bovino fetal/poço. Após remoção das células, os poços foram lavados com PBS com a finalidade de se remover eventuais células remanescentes. A adesão espontânea das diferentes populações de leucócitos (controle) foi monitorada por meio de ensaio semelhante, porém na ausência de FN ou VN. Ambas as frações foram enumeradas

com auxílio de hemocítômetro e a porcentagem de adesão foi expressa conforme a fórmula a seguir:

$$\% \text{ de adesão} = \left\{ \frac{\text{n}^\circ \text{ de células aderentes}}{\text{células n}^\circ \text{ de células aderentes} + \text{n}^\circ \text{ de células não aderentes}} \right\} \times 100$$

### 3.14. PRESENÇA DE MOLÉCULAS DE ADESÃO

Amostras de sangue contendo aproximadamente  $10^6$  leucócitos ( $100\mu\text{l}$ ) foram incubadas, por 1 e 12 horas, com uleína nas concentrações de 1 e  $10\mu\text{g/ml}$ ; em seguida, as células foram lavadas com PBS e adicionadas de  $5\mu\text{l}$  de solução de anticorpos monoclonais conjugados à ficoeritrina (PE) para  $\alpha_4\beta_1$  (Pharmingen/BD) e ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) para  $\alpha_5\beta_1$  (Immunotech) e  $\alpha_L\beta_2$  (Pharmingen/BD). Após incubação ao abrigo da luz por quinze minutos a temperatura ambiente, adicionou-se 2ml de solução *FACS™ Lysing Solution* (Becton Dickinson) em cada tubo. Após dez minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as células marcadas foram lavadas duas vezes com PBS ( $800g/5\text{min}$ ) e ressuspensas em  $0,5\text{ml}$  de solução de paraformaldeído 1%. Os níveis de expressão de  $\alpha_L\beta_2$ ,  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_5\beta_1$  pelos diferentes tipos de leucócitos foram analisados em um citômetro de fluxo Becton Dickinson, modelo FACSCalibur, equipado com laser Argônio 488nm.

Em todas as determinações citométricas, um mínimo de  $10^4$  células foi analisado e a linha limite de detecção baseou-se na máxima coloração obtida com a mesma população, porém sem estar marcada com o anticorpo monoclonal. Foram consideradas células positivas aquelas que expressaram fluorescência acima de 1% da linha limite e os resultados estão apresentados como a porcentagem média da expressão para cada grupo de leucócito, mais ou menos um erro padrão da média (EPM), de pelo menos três experimentos independentes.

### 3.15 ENSAIO DE IMUNOMODULAÇÃO

A influência da uleína na proliferação de linfócitos humanos, estimulados ou não por fitohemaglutinina (PHA), foi investigada por meio de curvas de crescimento celular determinadas após 120 horas de incubação (Berger, 1979; Hume e Weidemann, 1980). Células mononucleares (MNC;  $2 \times 10^5$ ) ressuspensas em RPMI 1640 suplementado com 10% de soro humano foram adicionadas a poços de placas estéreis de 96 cavidades, incubadas a 37°C, por 5 dias, em atmosfera de 5 a 10% de CO<sub>2</sub>, na presença de uleína ( $10^{-3}$  a 100 µg/ml). Em alguns experimentos, meio contendo fitohemaglutinina (Meio para Cariótipo Cultilab, Campinas/SP), na concentração de 10% (v/v), foi adicionado ao sistema. Após incubação, as células MNC foram transferidas para tubos de ensaio apropriados e analisadas com um citômetro de fluxo modelo FACSCalibur, equipado com laser de Argônio (488nm) e detectores de dispersão para tamanho e complexidade interna, Becton Dickinson. Para cada análise, eventos foram adquiridos por 45 segundos na velocidade média em escala linear e, gráficos baseados no tamanho (FSC - *forward light scatter*) e na complexidade interna (SSC - *side light scatter*) das células foram construídos. Delinearam-se janelas discriminatórias para as populações de linfócitos (R1), blastos (R2) e células mortas/debris celulares (R3). Os dados foram analisados usando-se o *software* WinMDI 2.8. Cada ensaio foi realizado em triplicata e, como resultado de cada experimento, utilizou-se a média da triplicata. O efeito proliferativo foi avaliado através do índice de proliferação (IP) (Gaines et al., 1996), onde a média aritmética das triplicatas (X) dos valores obtidos por ensaio foram aplicadas como a seguir:

$$IP = \frac{X \text{ (células detectadas em R2)}_{\text{teste}}}{X \text{ (células detectadas em R2)}_{\text{controle}}}$$

A porcentagem de transformação blástica foi avaliada usando-se a média aritmética das triplicatas (X) dos valores obtidos, como a seguir:

$$TB (\%) = \frac{100 \text{ (células presentes em R2 - células presentes em R1)}}{\text{células presentes em R2}}$$



A morfologia das células de citocentrifugados corados dos diferentes grupos foi observada sob imersão em microscópio de luz. Linfócitos foram reconhecidos por seu aspecto morfológico característico, apresentando-se como células arredondadas, pequenas, elevada relação núcleo-citoplasmática, citoplasma escasso, de coloração azul, ausência de granulação específica, núcleo arredondado com cromatina densa e agregados irregulares, com eventual presença de estruturas semelhantes a nucléolos, porém mal definidos. Linfócitos transformados pela ação da fitohemaglutinina foram considerados como blastos e identificados como células maiores do que linfócitos não-ativados, citoplasma azul intenso, geralmente vacuolizado, com Complexo de Golgi desenvolvido, cromatina delicada, presença de dois ou mais nucléolos visíveis, proeminentes e delineados, com volume aumentado.

### 3.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como a porcentagem média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para análise estatística dos resultados, usou-se o teste *t* e o *software* InStatSoft. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

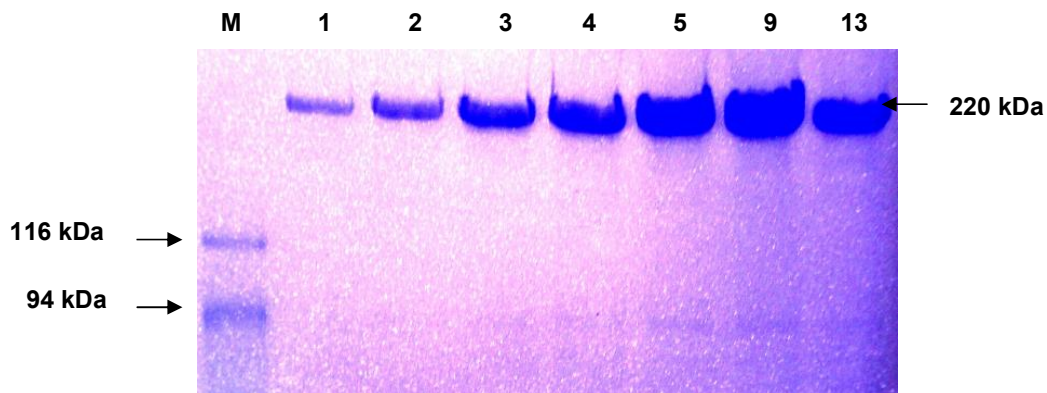
### 4.1. PURIFICAÇÃO DE FIBRONECTINA E VITRONECTINA

A fibronectina (FN) é uma proteína de natureza adesiva, não reagente com receptores de adesão na sua forma solúvel, mas altamente adesiva quando insolúvel, sendo proeminente na matriz extracelular de uma variedade de tecidos conjuntivos e membranas basais (Magnusson e Mosher, 1998) que, junto com a vitronectina (VN), outra glicoproteína relacionada à adesão celular, estão presentes no plasma ou soro de mamíferos, como revisto na introdução deste trabalho. Para o estudo da influência da uleína na adesão celular, ambas foram obtidas de plasma humano por meio de cromatografia de afinidade.

Fibronectina foi purificada por meio de coluna de Sepharose-gelatina, seguida de eluição com solução de uréia em tampão Tris, resultando em quinze frações. Destas, somente as frações de 1 a 13, após serem submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e coloração com solução de Azul Brilhante de Coomassie, mostraram nítida banda, única, com massa molecular de aproximadamente 220 kDa, semelhante a resultados relatados por outros usando metodologia semelhante (Manabe et al., 1997).

A obtenção de FN foi confirmada por *Western blot*, onde transferência das bandas obtidas no gel de poliacrilamida em condições desnaturantes para membranas de nitrocelulose, seguida de tratamento com anticorpos específicos para FN humana, confirmou a presença de uma única banda, com a mesma massa molecular de cerca de 220 kDa, como ilustrado na Figura 3.

Os resultados cromatográficos e eletroforéticos obtidos com o processo de purificação da FN estão de acordo com o esperado quando sua fonte é o plasma humano, pois esta proteína geralmente existe como um dímero composto por duas subunidades ligadas por um par de pontes dissulfeto, próximo a carboxila terminal (Ruoslahti, 1988). Entretanto, quando submetida a condições desnaturantes, como a realizada neste trabalho, resulta em banda única, com a massa molecular encontrada, pois, nessas condições, são rompidas pontes dissulfeto, com visualização da sua forma monomérica. Já na eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes, quase toda a fibronectina aparece como dímero (Manabe et al., 1997), com massa molecular de aproximadamente 450 kDa.



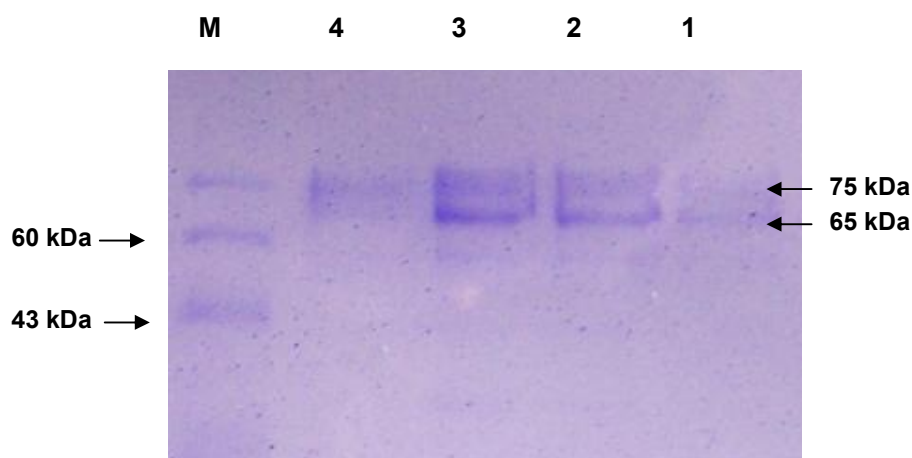
**Figura 3. Fibronectina obtida de plasma humano.** Gel de poliacrilamida em condições redutoras corado com Azul Brilhante de Coomassie mostrando as frações indicadas de fibronectina obtidas de plasma humano, após eluição em coluna Sepharose-gelatina com solução de uréia em tampão Tris pH 7,5 e diálise em PBS. **M:** marcador de massa molecular.

Após reunião dessas 13 frações eluídas, seguida de diálise em PBS, obteve-se, então, FN humana purificada, na concentração de 0,341mg/ml, de acordo com quantificação espectrofotométrica em 280nm, cuja absorvância foi de 0,436, num volume total de 40 ml.

Da mesma forma como para a FN, cromatografia de afinidade usando-se coluna de Sepharose-heparina foi usada para obtenção de VN, a qual, depois de eluída, demonstrou, como esperado, duas bandas em eletroforese em gel de poliacrilamida. Após transferência para membrana de nitrocelulose, reação com anticorpos de coelho específicos para VN humana revelou a presença dessas bandas, com massa molecular de aproximadamente 65 e 75 kDa, características da VN (Hayman et al., 1983), conforme ilustrado na Figura 4. Obteve-se VN purificada na concentração de 0,116 mg/ml, num volume final de 40 ml, resultante de uma absorvância de 1,38 em 280nm.

O rendimento da VN foi pelo menos um terço inferior àquele obtido para FN. Entretanto, apesar de sua estrutura primária, a seqüência de seu DNAC (Jenne e Stanley, 1985; Suzuki et al., 1985) e domínios estruturais serem conhecidos (Suzuki et al., 1984), os procedimentos de purificação da VN parecem ser relativamente ineficientes. Como já relatado por outros (Barnes e Silnutzer, 1983; Hayman et al., 1983; Suzuki et al., 1984), tanto o plasma como o soro humano apresentam de 10 a

40 mg% de VN, mas apenas pequena quantidade é isolada usando esta metodologia, com um rendimento esperado entre 0,5 a 20%. Portanto, o rendimento de VN obtido, embora baixo, está de acordo com o esperado quando se tem o plasma humano como fonte e a metodologia utilizada para sua purificação.



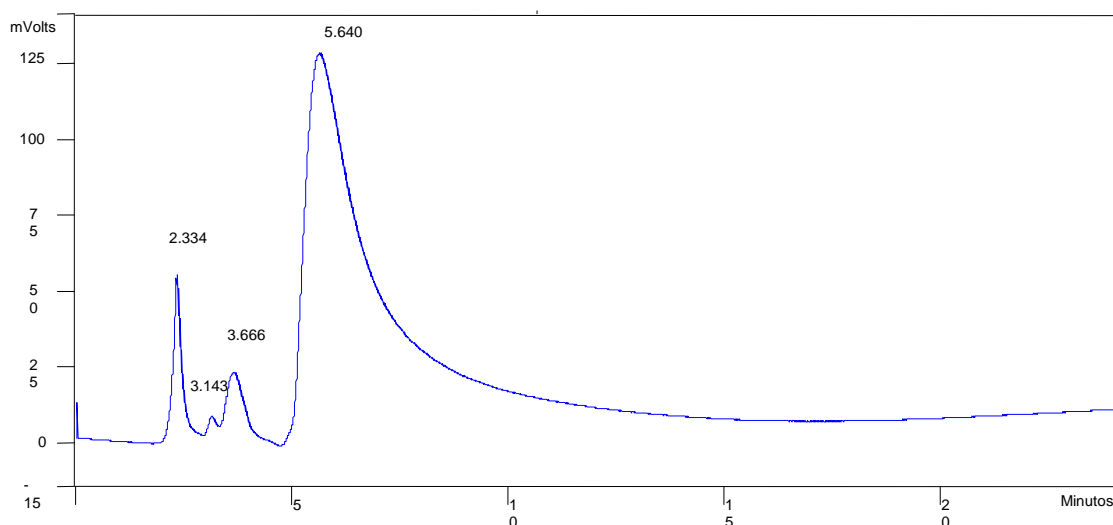
**Figura 4. Vitronectina obtida de plasma humano.** Gel de poliacrilamida em condições redutoras corado com Azul Brilhante de Coomassie mostrando as frações indicadas de vitronectina obtidas de plasma humano após eluição de coluna Sepharose-heparina com solução EDTA, uréia e tampão fosfato-salina 10mM, seguida de diálise em PBS. **M:** marcador de massa molecular.

#### 4.2 ANÁLISE DA ULEÍNA

Com a finalidade de se avaliar o conteúdo da fração alcaloídica extraída das cascas de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson que seria utilizada para o estudo dos efeitos biológicos da uleína, uma alíquota do material foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cujo perfil cromatográfico está apresentado na Figura 5.

Nele, dos três picos distintos, o com tempo de retenção de 5,64 minutos foi identificado como sendo o da uleína, cuja concentração na amostra foi de 93,4%. O pico com tempo de retenção de 3,66 minutos foi identificado como a epi-uleína, um isômero da uleína que, embora em quantidades pequenas, sempre está presente nos processos de isolamento e purificação da uleína. Esses resultados

demonstraram e confirmaram ser a uleína o componente majoritário da amostra a ser utilizada nos ensaios experimentais.



**Figura 5. Perfil cromatográfico da fração alcaloídica extraída de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson.** A fração rica em alcalóides obtida das cascas de *H. lancifolius* foi diluída em acetonitrila:metanol (1:9) e analisada por CLAE em 305nm, coluna C18, fluxo de 0,8ml/min, por 45 minutos. Uleína foi identificada pelo tempo de retenção de 5,64 minutos e epi-uleína, em 3,66 minutos.

#### 4.3 EFEITO DA ULEÍNA SOBRE A VIABILIDADE DE LEUCÓCITOS HUMANOS

##### 4.3.1 Obtenção de frações de leucócitos humanos

Para o estudo das atividades biológicas da uleína proposto neste trabalho, utilizaram-se leucócitos obtidos de sangue periférico de doadores saudáveis. Por apresentarem características distintas, não só morfológicas, mas também funcionais, os leucócitos foram divididos em duas populações, mononucleares (MNC) e granulócitos (GRN), ambas obtidas após centrifugação sobre um gradiente de densidade.

O conteúdo celular dessas frações está apresentado na Tabela 3 e, como esperado, citocentrifugados corados com May-Grünwald-Giemsa dessas populações demonstraram que linfócitos e monócitos predominaram entre as células MNC ( $\geq 94\%$ ), enquanto neutrófilos e eosinófilos constituíram mais de 95% da fração dos

GRN (n=6). Além disso, somente amostras contendo  $\geq 90\%$  de células viáveis após o processo de isolamento, avaliadas pelo teste de exclusão com azul de tripano, o qual tem a propriedade de penetrar em células cuja permeabilidade seletiva da membrana tenha sido prejudicada (Merchant et al., 1964), foram utilizadas nos experimentos.

**Tabela 3.** Tipos celulares presentes nas subpopulações de leucócitos obtidos de sangue periférico de voluntários saudáveis, após centrifugação sobre gradiente de densidade.

Exp	Fração Celular	Tipos celulares (%)				
		Seg	Bast	Eos	Linf	Mono
1	GRN	85	09	05	01	-
2		90	05	03	02	-
3		85	08	06	01	-
4		79	10	07	03	01
5		89	08	03	-	-
6		90	06	02	01	01
1	MNC	03	-	01	93	03
2		01	-	-	97	02
3		01	-	-	92	07
4		-	-	-	98	02
5		05	01		86	08
6		04	02		89	05

Citocentrifugados corados com May-Grünwald-Giemsa foram preparados após separação entre mononucleares (**MNC**) e granulócitos (**GRN**) usando gradiente de densidade (ver Material e Métodos) e observados em imersão, sob microscopia de luz. Em cada experimento (**exp**), pelo menos 100 células foram identificadas morfolologicamente e cada valor representa a porcentagem de cada tipo leucocitário identificado. Seg: neutrófilos segmentados; Bast: neutrófilos bastonetes; Eos: eosinófilos; Baso: basófilos; Linf: linfócitos; Mono: monócitos.

#### 4.3.2 Toxicidade da uleína para leucócitos humanos

Para se estudar o efeito biológico da uleína sobre leucócitos humanos, avaliou-se, primeiramente, seu potencial tóxico. Neste contexto, o ensaio que utiliza o corante azul de tripano é muito útil, pois permite observar o efeito do composto escolhido diretamente sobre as células em estudo, as quais possuindo membrana

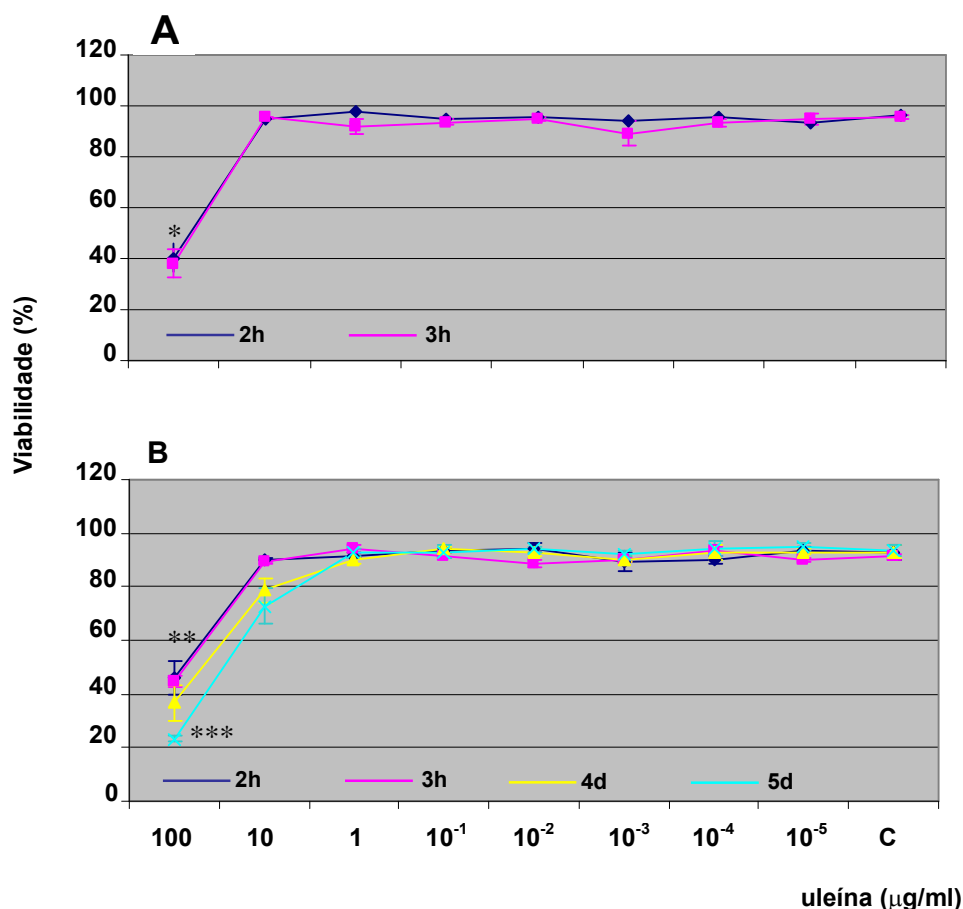
citoplasmática íntegra, com preservação da sua permeabilidade seletiva, excluem o corante (Merchant et al., 1964), como já citado anteriormente. Dessa forma, células viáveis, após alguns minutos de exposição ao corante, apresentam-se incolores, esféricas e refringentes. Em contraste, células parcial ou totalmente coradas em azul representam as danificadas ou mortas. O efeito tóxico sobre cada população é, então, expresso em relação à percentagem de células vivas.

GRN e MNC foram, então, expostos à concentrações crescentes de uleína ( $10^{-5}$  a 100  $\mu\text{g/ml}$ ) e seus efeitos tóxicos investigados sob microscopia de luz. Para GRN, análise microscópica foi feita após duas e três horas de incubação com a uleína a 37°C, tempo máximo de duração dos ensaios biológicos a serem realizadas com essa população. Para MNC, os efeitos tóxicos foram avaliados após duas e três horas a 37°C e, também, após quatro e cinco dias a 37°C, sob atmosfera de 5-10% de  $\text{CO}_2$ , tempo necessário para se avaliar a atividade imunomodulatória.

Como ilustrado na Figura 6-A, somente na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$  é que a uleína apresentou toxicidade para GRN, onde apenas  $38,0 \pm 5,5\%$  ( $p < 0,0004$ ) das células se mostraram íntegras após 3 horas de incubação ( $n=3$ ). Entretanto, concentrações inferiores (10 a  $10^{-5}\mu\text{g/ml}$ ) do alcalóide não interferiram com a integridade dessas células, as quais se mantiveram com viabilidade de  $95,3 \pm 0,3$ ,  $92 \pm 3,0$ ,  $93,7 \pm 1,2$ ,  $95 \pm 0,6$ ,  $89 \pm 4,7$ ,  $93,7 \pm 1,5$ ,  $94,7 \pm 2,0$  e  $95,5 \pm 0,9\%$ , respectivamente, valores próximos ao observado para o controle ( $95,5 \pm 0,9\%$ ,  $n=3$ ), após 3 horas de incubação.

Em relação aos MNC, efeito tóxico na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$  de uleína foi mais evidente após 5 dias de incubação, com somente  $23,3 \pm 0,9\%$  ( $p < 0,00001$ ) de células viáveis (Figura 6-B). Nesta mesma concentração, após 3 horas de incubação,  $44,7 \pm 2,2\%$  ( $p < 0,00005$ ) dos MNC apresentaram-se íntegros. Em contraste, as demais concentrações não se apresentaram tóxicas, mantendo a viabilidade dos MNC superior a 90%, próxima à observada para o controle após quatro ( $93,0 \pm 2,5\%$ ) e 5 ( $93,3 \pm 2\%$ ) dias de incubação.

Estes resultados demonstraram que a concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$  de uleína é, de fato, tóxica tanto para GRN como para MNC humanos e que, em concentrações inferiores, este alcalóide não se mostra nocivo a estas células nas condições experimentais estabelecidas.



**Figura 6. Toxicidade da oleína sobre leucócitos humanos.** Leucócitos humanos obtidos de sangue periférico de voluntários saudáveis, após isolamento em gradiente de densidade, foram separados em granulócitos (A) e mononucleares (B) e expostos às concentrações indicadas de oleína, incubados por duas (2h) e três horas (3h), e/ou por quatro (4d) e cinco dias (5d), conforme indicado, em atmosfera de 5-10% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Cada ponto representa a percentagem média ± EPM de células viáveis, verificada pelo teste com azul de tripano, de pelo menos três experimentos independentes, realizados em triplicata. C denota células não expostas ao alcalóide (controle). (\*)  $p < 0,0004$ ; (\*\*)  $p < 0,00005$  e (\*\*\*)  $p < 0,00001$  em relação ao controle (C) (teste *t*).

Neste contexto, embora os dados apresentados favoreçam o uso da oleína para estudos biológicos com células humanas em concentrações inferiores a 100µg/ml, é preciso ressaltar que resultados de experimentação *in vitro* não devem ser comparados com a dinâmica de um organismo vivo, pois neles têm-se um acúmulo de metabólitos no meio de cultura, os quais, devido à ausência das vias de biotransformação e excreção como normalmente ocorre *in vivo*, não podem ser



eliminados do sistema, causando efeito nocivo que pode superestimar a toxicidade de substâncias (Hayes e Markovic, 2002).

#### 4.4 ENSAIOS DE ADESÃO

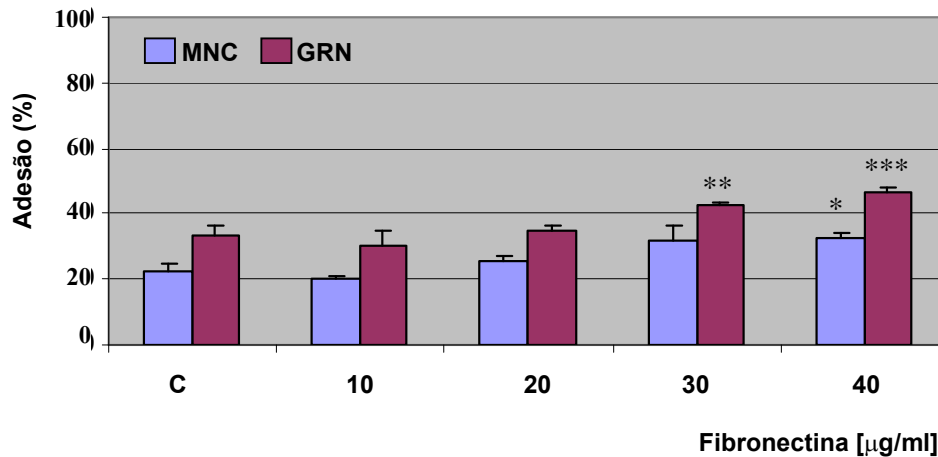
Leucócitos obtidos de sangue periférico, quando manipulados *in vitro*, demonstram habilidade em aderir espontaneamente à superfície de materiais inertes, incluindo vidro ou plástico (Mosier, 1984). Entretanto, esta função adesiva difere para cada tipo de leucócito e depende do material utilizado, da presença ou não de um ou mais agentes indutores ou mesmo do tempo de exposição e da temperatura impostos pelo protocolo experimental.

Sendo um dos objetivos deste trabalho investigar a influência da uleína sobre a capacidade de interação entre subpopulações de leucócitos humanos e moléculas da matriz extracelular em um sistema *in vitro*, com protocolo experimental definido, inicialmente investigou-se o comportamento adesivo natural desempenhado por MNC e GRN humanos à base do frasco de cultura. Em seguida, essas frações celulares foram expostas a concentrações crescentes de FN (10 a 40 µg/ml) e de VN (5 a 40 µg/ml), duas das proteínas integrantes da matriz extracelular de mamíferos, purificadas de plasma humano como anteriormente descrito e imobilizadas sobre a base de frascos de cultura.

Como ilustrado na Figura 7, observou-se adesão espontânea de ambas as frações de leucócitos à base do frasco de cultura, sendo que os valores encontrados foram de  $22,3 \pm 2,3\%$  e de  $33,6 \pm 2,9\%$  de células aderidas para MNC e GRN, respectivamente, confirmando resultados anteriores obtidos em nosso laboratório (Perini, 2003).

Quando expostas à FN, ambas as frações mostraram-se competentes em aderir ao substrato com muito maior avidez, sendo este efeito proporcional à concentração de FN. Entretanto, diferente perfil de adesão foi observado entre as duas subpopulações de leucócitos. Ou seja, GRN demonstraram ser mais eficientes, independente da concentração, em aderir à FN do que MNC. Por exemplo, nas concentrações de 30 e 40 µg/ml de FN, observou-se que  $42,4 \pm 1,0\%$  (n=4; p<0,02) e  $46,5 \pm 1,2\%$  (n=4; p<0,004) dessas células, respectivamente, mantiveram-se significativamente aderidas, enquanto que, para MNC, efeito significativo em relação

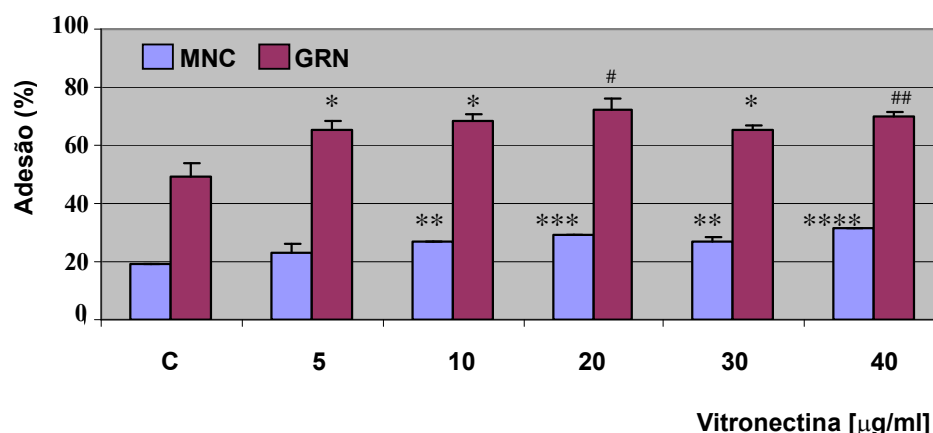
à população controle só foi observado na concentração de 40µg/ml, com somente  $32,3 \pm 2,0\%$  ( $p < 0,01$ ) de adesão.



**Figura 7. Adesão de leucócitos humanos a fibronectina imobilizada.** Leucócitos humanos de sangue periférico foram separados em mononucleares (MNC) e granulócitos (GRN) após centrifugação sobre gradiente de densidade e estimulados a aderir à base do frasco de cultura, na presença das concentrações indicadas de fibronectina, durante 1h a 37°C. Cada barra representa a porcentagem média  $\pm$  EPM de células aderidas de quatro experimentos independentes, realizados em triplicata. (\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*)  $p < 0,02$ ; (\*\*\*)  $p < 0,004$  em relação à população não exposta a fibronectina (C) (teste *t*).

Da mesma forma como observado para a FN, as duas frações de leucócitos mostraram-se eficientes em aderir à base do frasco contendo VN imobilizada (Figura 8), com  $19,1 \pm 0,5\%$  e  $49,2 \pm 5\%$  de células aderidas para MNC e GRN, respectivamente.

Só que neste caso, o perfil de adesividade foi distinto daquele observado na presença de FN, onde para MNC, adesão significativa em relação à população controle foi observada já a partir de 10µg/ml, com  $26,8 \pm 0,4\%$  ( $n=6$ ;  $p < 0,003$ ) de células recuperadas da fração aderente, efeito que permaneceu muito semelhante em todas as concentrações de VN avaliadas. Ou seja, para 20, 30 e 40µg/ml de VN, observou-se, respectivamente,  $29,2 \pm 0,3\%$  ( $p < 0,001$ ),  $27,1 \pm 1,3\%$  ( $p < 0,01$ ) e  $31,2 \pm 0,5\%$  ( $p < 0,0001$ ) de células aderidas.



**Figura 8. Adesão de leucócitos humanos a vitronectina imobilizada.** Leucócitos humanos de sangue periférico foram separados em mononucleares (MNC) e granulócitos (GRN) após centrifugação sobre gradiente de densidade e estimulados a aderir à base do frasco de cultura, na presença das concentrações indicadas de vitronectina, durante 1h a 37°C. Cada barra representa a porcentagem média  $\pm$  EPM de células aderidas de 6 experimentos independentes, realizados em triplicata. (\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*)  $p < 0,003$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ ; (#)  $p < 0,05$  e (##)  $p < 0,005$  em relação à população não exposta a vitronectina (C) (teste *t*).

E, como para a FN, GRN demonstraram maior adesão a VN em relação aos MNC, com  $65,6 \pm 2,6\%$  ( $n=6$ ;  $p < 0,01$ ) de células aderidas já na concentração de  $5\mu\text{g/ml}$ , efeito que, à semelhança dos MNC, persistiu em todas as concentrações ensaiadas, com a curva dose-resposta assumindo, também, a forma de *plateau* [para  $10\mu\text{g/ml}$ ,  $68,4 \pm 2,1\%$  ( $p < 0,01$ ); para  $20\mu\text{g/ml}$ ,  $72,1 \pm 3,8\%$  ( $p < 0,05$ ); para  $30\mu\text{g/ml}$ ,  $65,7 \pm 1,5\%$  ( $p < 0,01$ ) e para  $40\mu\text{g/ml}$ ,  $70,1 \pm 1,3\%$  ( $p < 0,005$ ) de células aderidas].

Estes resultados demonstraram que, apesar de se ter observado interação significativa entre os leucócitos humanos e as duas proteínas da MEC, foi nítida a diferença de intensidade deste efeito.

As integrinas, como revisto na introdução deste trabalho, formam a principal família de receptores envolvidos com os processos de adesão celular e, por se encontrarem na superfície das células, são o principal recurso destas para interagirem entre si e com os constituintes da matriz extracelular e a interação entre elas e tais constituintes pode ocorrer de diversas formas.

A maneira diferenciada como monócitos e neutrófilos interagem com a FN é conhecida há pelo menos duas décadas (Brown e Goodwin, 1988). Em monócitos, há, pelo menos, dois receptores distintos que interagem com a FN, ambos reconhecendo sua porção RGD e que necessitam de  $\text{Ca}^{++}$  para seu reconhecimento, com subsequente ligação.

O primeiro deles liga-se somente à FN, mas não a outras proteínas contendo a região RGD, e é semelhante aos receptores descritos em fibroblastos (*fibroblast like*). Além disso, estes receptores só interagem com a molécula de FN íntegra. O segundo tipo de receptores, descritos em plaquetas (*platelet like*), reconhece a sequência RGD não só da FN, mas também de outras proteínas, incluindo o fibrinogênio, o fator von Willebrand e a VN (Akiyama et al., 1986; Ruggeri et al., 1986) e permite a ligação da célula com fragmentos de FN pequenos, originados de digestão enzimática com quimiotripsina, e com o decapeptídeo sintético KYAVTGRGDS, derivado da sequência da FN. Ainda, este segundo receptor parece ser o responsável pelo aumento da atividade fagocítica em monócitos quando expostos a FN, VN, fibrinogênio ou ao colágeno tipo IV. Para os neutrófilos, foram descritos somente os receptores *platelet like* (Brown e Goodwin, 1988).

A FN é uma proteína adesiva multimérica, de distribuição ubíqua, presente tanto na forma solúvel circulante como em uma forma menos solúvel, presente nos fluidos do organismo (Yamada e Kennedy, 1979), além de ser parte integrante da MEC, onde coopera com o posicionamento e fixação das células, levando ao seu amoldamento adequado. Essa ampla distribuição confere heterogeneidade à molécula de FN, produzindo variantes que possuem propriedades diferenciadas quanto às funções adesivas, de interação com ligantes e de solubilidade, possibilitando, às células, alterar a composição da matriz extracelular de um modo particular, necessário à especificidade de cada tecido.

Neste contexto, FN purificada de diferentes fontes apresentam diferenças com respeito ao tamanho de suas subunidades, decorrentes de *splicing* alternativos do transcrito primário (Yamada e Kennedy, 1979). Assim, torna-se mais simples entender as diferentes maneiras com que a FN interage com as células. Um exemplo é o fato de que leucócitos circulantes expressando receptores de baixa afinidade reterão sua capacidade de aderir à FN imobilizada, que é depositada nos locais de injúria ou durante o reparo tecidual. Em contraste, as células presentes no

tecido, como fibroblastos, por exemplo, têm que expressar receptores de alta afinidade para poderem ligar FN, processo central na captura e retenção de FN plasmática para a formação e manutenção da matriz extracelular (Akiyama et al., 1989).

A FN interage com as células por meio de três regiões distintas: o domínio central, o domínio ligante de glucosaminoglicanos (HepII) e pelo segmento III<sub>CS</sub> (ver Figura 1, pág. 9). Como já abordado na introdução deste trabalho, algumas dessas regiões da molécula contém seqüências de aminoácidos que são reconhecidas pelas integrinas, uma família de receptores heterodiméricos, estrutural e funcionalmente relacionados, presentes na superfície de várias células, como  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  e  $\alpha_4\beta_1$  (Hynes, 1987; Hynes, 1992).

Uma dessas regiões, a qual está presente em todos os tipos de FN e está localizada no domínio central da molécula, mais precisamente no módulo III<sub>10</sub>, contém a seqüência RGD (Pierschbacher et al., 1981), seu sítio de interação celular mais conhecido e estudado. O reconhecimento deste sítio por ligantes depende dos resíduos adjacentes (Ruoslahti, 1988), da sua estrutura tridimensional (ou espacial) e das características individuais da molécula na qual ele está presente (Pankov e Yamada, 2002). Em conjunto, refletem uma maior ou menor afinidade de ligação entre a FN e a célula.

A seqüência RGD confere especificidade à ligação FN-receptor, a qual é resultante da organização espacial de seus três aminoácidos, que se localizam, dentro do segmento III<sub>10</sub>, em uma alça flexível da molécula, que se projeta para fora de seu corpo, sendo ora mais, ora menos acessível aos ligantes. Assim, qualquer alteração na conformação da molécula de FN pode aumentar ou diminuir a acessibilidade de um ligante a esta região. Neste contexto, a deposição de FN e sua interação com componentes da matriz extracelular *in vivo* pode modular a expressão de sítios de ligação, incluindo a região RGD. A deposição de FN sobre superfícies inertes, imobilizando-a, provoca uma alteração de sua conformação e contribui para aumentar seu potencial adesivo (Ugarova et al., 1995), propriedade esta que foi explorada neste trabalho para avaliar os efeitos da uleína sobre a adesão de leucócitos periféricos.

Da mesma forma, qualquer distorção ou achatamento desta alça contendo a região RGD pode provocar uma alteração da interação célula-FN (Labat-Robert,

2003) e que pode se refletir na especificidade de interação apresentada por diferentes ligantes.

Recentemente, demonstrou-se que esta região só se mostra totalmente ativa quando existe, próximo a ela, a sequência PHSRN, presente no módulo III<sub>9</sub> adjacente (Altroff et al., 2001; Mould et al., 2000). A interação sinérgica entre esses módulos parece conferir estabilidade à molécula de FN e cria um sítio de ligação tão distinto, ao ponto de tornar possível o acesso de uma única molécula de integrina (Leahy et al., 1996).

Das integrinas celulares que interagem com a FN, somente a  $\alpha_5\beta_1$  reconhece especificamente a FN através da sequência RGD, provavelmente pela porção  $\alpha_5$  (Pankov e Yamada, 2002). Além disso,  $\alpha_5\beta_1$  liga-se preferencialmente aos peptídeos RGD que possuem glicina e triptofano justapostos (RGDGW), e, ainda, reconhece com exclusividade peptídeos que contêm a sequência Arg-Arg-Glu-Thr-Ala-Trp-Ala (RRETAWA) (Mould et al., 2000), ratificando que a sequência de aminoácidos ao redor do sítio de ligação celular também contribui para facilitar ou dificultar a interação entre receptores e seus ligantes.

Além do módulo III<sub>10</sub>, o receptor  $\alpha_5\beta_1$  também interage com o segmento da FN contendo os módulos I<sub>1-9</sub> e II<sub>1,2</sub>, os quais também estão envolvidos nos processos de adesão celular. Entretanto, a interação de uma integrina com este sítio N-terminal pode desencadear sinais intracelulares distintos daqueles gerados em resposta a ligações com o segmento RGD (Pankov e Yamada, 2002).

As integrinas estão envolvidas em várias funções celulares que podem ser moduladas em vários tipos de células, dependendo de sua conformação. A ativação de plaquetas (O'Toole et al., 1990) e a adesão de leucócitos (Hibbs et al., 1991; Pelletier et al., 1996) são os exemplos mais bem conhecidos deste fenômeno, os quais transitam de um estado em suspensão (circulante) para um de adesão. Nestas células, as integrinas apresentam pelo menos dois estados conformacionais. O primeiro, demonstrando baixa afinidade pelo ligante, é expresso pelas células em seu estado basal. O segundo estado, o qual envolve muito maior afinidade pelo ligante, está presente em células após ativação. Os sinais que iniciam a transição desses receptores de um estado de baixa para um de alta afinidade incluem, particularmente nos leucócitos, uma variedade de substâncias, como o peptídeo

formilado fMLP, o fragmento C5a do complemento, o produto do metabolismo do ácido aracdônico LTB4 e a quimiocina MCP-1, dentre outras (Carlos e Harlan, 1994).

Interessante ressaltar que fragmentos maiores de FN medeiam a migração de monócitos, mas não a de neutrófilos (Norris et al., 1982), indicando que a ocupação de um mesmo receptor em células diferentes leva a cabo funções celulares distintas. Talvez esta seja a resposta para o fato de que monócitos não ativados aumentam sua atividade fagocítica quando expostas a FN, enquanto neutrófilos requerem a presença adicional de agentes, como peptídeos formilados ou a fração C5a do complemento, para desempenharem função similar.

Esta modulação é necessária e explica como, por exemplo, na resposta inflamatória aguda, leucócitos circulantes aderem ao endotélio e, em seguida, são liberados deste, com o propósito de fazer diapedese e, subseqüentemente, migrar em direção a um estímulo tecidual, e lá são mantidos confinados, distanciados dos tecidos adjacentes, protegidos de danos.

Estes dois estados de interação já foram descritos para a integrina  $\alpha_5\beta_1$  (Faull et al., 1993). Também já foi demonstrado que a adesão à FN solúvel, ou plasmática, via  $\alpha_5\beta_1$  envolve receptores de baixa afinidade (Faull et al., 1993), enquanto a adesão a ligantes imobilizados (como a FN tecidual ou a presente na base de frascos de cultura em modelos *in vitro*) envolve um processo mais complexo, de várias etapas. Inicia-se com uma adesão “fraca”, que precede uma interação mais “intensa”, a qual requer a participação de eventos intracelulares que são dependentes da geração de ATP, reorganização do citoesqueleto, com formação de contatos focais, e simultâneo espalhamento celular (Burrige et al., 1988).

Estruturas adesivas resultantes de mudanças na dinâmica de polimerização da actina já foram descritas para muitos tipos de células fibroblásticas (Nobes e Hall, 1995). Entretanto, células de linhagem hematopoética não formam esses contatos focais, mas exibem estruturas adesivas bioquimicamente similares denominadas podossomos, os quais contém a sinalização apropriada e as proteínas adaptadoras para desempenhar suas funções adesivas e migratórias dependentes da extensão da membrana (Worthylake et al., 2001).

Além da  $\alpha_5\beta_1$ , a molécula de FN contém regiões extracelulares específicas que reconhecem a integrina  $\alpha_4\beta_1$ , também envolvida nos processos de adesão

celular. A primeira delas é a região HepII, principal sítio de interação da FN com proteoglicanos, e a outra é o segmento IIIICS, o qual, por alternativas de *splicing*, pode originar pelo menos cinco variantes na molécula humana (Wayner et al., 1989). Três sítios distintos para interação com  $\alpha_4\beta_1$ , dentro do segmento HepII/IIIICS, foram identificados: as duas sequências homólogas Leu-Asp-Val-Pro (LDVP) e Ile-Asp-Ala-Pro (IDAP) e a terceira sequência Arg-Gly-Asp, relacionada com o segmento RGD (Clements et al., 1994; Mould et al., 2000), sendo a sequência LDV o segmento chave para sua atividade (Komoriya et al., 1991). O módulo consiste de duas camadas de pregas tipo  $\beta$ , sendo uma com três e outra com quatro fitas antiparalelas, ambas incluindo uma sequência de 24 aminoácidos. O módulo contém a região RGD em uma alça flexível que conecta as duas fitas  $\beta$  (Main et al., 1992).

Em contraste com a ampla e variada distribuição da FN em humanos, a VN está presente mais restritamente, sendo observada no plasma, nas plaquetas e, no tecido conjuntivo, ARNm para VN só foi encontrado no trato genital masculino (Seiffert, 1997). Entretanto, sua deposição foi observada em áreas de fibrose e necrose em várias doenças, incluindo nefropatias, arteriosclerose e distúrbio degenerativos do sistema nervoso central (Seiffert, 1997). Ancora-se na matriz extracelular pelos seus sítios de interação com colágeno e heparina, promovendo adesão, amoldamento celular e migração após interação com as integrinas  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_{II}\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_6$  e  $\alpha_v\beta_8$  (Hess et al., 1995). Após a interação integrina-VN, ocorre ativação de eventos intracelulares que influenciam o rearranjo do citoesqueleto, o transporte de íons, o metabolismo lipídico e a expressão gênica (Meredith et al., 1996).

De modo semelhante à FN, a molécula de VN também possui a sequência RGD como sítio de interação celular e pode interagir com sub-unidades  $\beta$ , lembrando que a ligação também ocorre via receptor  $\alpha_v\beta_3$  (Boettiger et al., 2001b), cuja expressão já foi relatada em fibroblastos, células endoteliais e células hematopoéticas maduras, como megacariócitos/plaquetas, mastócitos, osteoclastos e osteoblastos, monócitos/macrófagos e neutrófilos (Horton, 1997). Entretanto, diferente das características da FN, esta interação envolve pelo menos três estados distintos de ativação, definidos de acordo com a força de interação entre receptor e ligante e modula o grau de afinidade (ou força de interação) entre a VN e a célula.



Este evento ocorre em cascata, sendo a interação anterior o fator desencadeante e potencializador do estágio seguinte, com amplificação da força de ligação. Neste contexto, o domínio intracelular da porção  $\beta_3$  da integrina  $\alpha_v\beta_3$  contém resíduos de tirosina nas posições 747 (Y747) e 759 (Y759) (Datta et al., 2002). Após a interação de  $\alpha_v\beta_3$  com a VN, representativa de uma ativação de baixa força, ocorre a fosforilação de Y747, a qual se potencializa, resultando numa interação de força maior. O terceiro e último estágio desta interação é dependente da disponibilidade de Y759 para interagir com proteínas celulares (Boettiger et al., 2001a).

O receptor  $\alpha_v\beta_3$ , à semelhança de  $\alpha_5\beta_1$ , também possui dois modos conformacionais de ligação (Pelletier et al., 1996). O primeiro é representado pela interação com a FN, produzindo uma ligação inicial (de baixa afinidade), a qual, por não transmitir sinais para dentro da célula, não altera a ligação com o citoesqueleto, ou seja, não envolve rearranjo de actina. O segundo modo de ação, em contraste, induz rearranjo do citoesqueleto, levando a um afrouxamento inicial da interação ligante-receptor, gerando uma ligação mais fraca; a sinalização intracelular gerada desta ação, por sua vez, aumenta a interação  $\alpha_v\beta_3$ -citoesqueleto, formando um complexo de forte ligação (ou alta afinidade), como o observado na interação com a VN (Boettiger et al., 2001b).

Com relevância particular para este trabalho, as integrinas  $\beta_3$  podem influenciar na função de outros receptores. Por exemplo, a integrina  $\alpha_v\beta_3$ , quando na presença da proteína integrina-associada (IAP), inibe o processo de fagocitose mediado por  $\alpha_5\beta_1$  de alta afinidade, por alterar sua conformação, não interferindo, entretanto, com a conformação de  $\alpha_5\beta_1$  de baixa afinidade envolvida no processo de adesão (Blystone et al., 1994).

Finalmente, proteoglicanos como heparina e heparan sulfato, participam como co-receptores do processo de adesão celular a proteínas da MEC. Na molécula da FN, por exemplo, há pelo menos dois domínios distintos que ligam heparina na porção N-terminal e pelo menos um domínio próximo à porção C-terminal (Barkalow e Schwarzbauer, 1991). Há relatos de que a presença de heparina ou moléculas similares pode facilitar a adesão celular à FN, onde a interação dessas moléculas com a FN provocaria uma mudança conformacional da porção externa da integrina, expondo a região RGD, de forma a permitir uma ligação FN-integrina de alta

afinidade. Assim, é possível que o processo de adesão de leucócitos à FN plasmática imobilizada seja mais eficiente se houver a cooperação de outras moléculas, como a heparina, como foi demonstrado na fagocitose de material particulado por macrófagos (Hynes e Yamada, 1982). Interessante seria, neste particular, repetir os experimentos realizados na presença de heparina e observar os efeitos daí decorrentes.

Essas considerações envolvendo não só mecanismos diferentes e complexos de interação entre célula-FN e célula-VN, mas também a intensidade dessas interações, derivadas da afinidade e do estado de ativação entre ligante e receptor, e a distribuição diferenciada dessas proteínas, podem justificar as diferenças observadas neste estudo com relação à adesão de MNC e GRN às matrizes FN e VN imobilizadas sobre frascos de cultura. Entretanto, com esta série de experimentos foi possível definir as concentrações ideais de FN e de VN a serem utilizadas nos protocolos experimentais de ensaios biológicos da uleína com leucócitos humanos. Ou seja, dentre as concentrações que se mostraram significativamente eficientes em promover a adesão de diferentes populações leucocitárias, optou-se pela de 40µg/ml para FN e de 20µg/ml para VN.

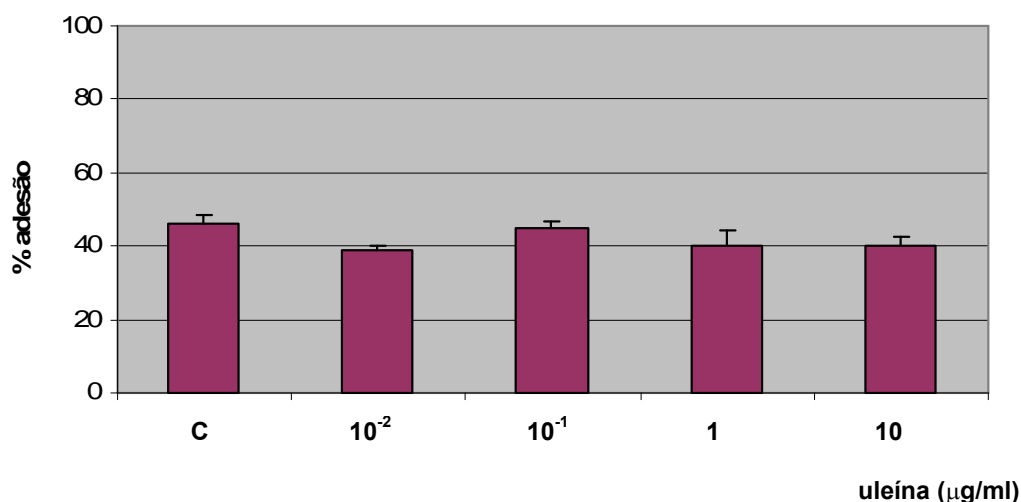
#### 4.5 EFEITO DA ULEÍNA SOBRE A ADESÃO ESPONTÂNEA DE GRANULÓCITOS HUMANOS À SUPERFÍCIES PLÁSTICAS

Para alcançar os locais de inflamação, os leucócitos circulantes devem sair da circulação sanguínea atravessando o endotélio (Murdoch e Finn, 2000). Então, empregam moléculas de adesão para, primeiro, se ligarem ao endotélio vascular e, posteriormente, migrarem para dentro dos tecidos adjacentes (Mackai e Rosen, 2000; Springer, 1994). Com a finalidade de se investigar os efeitos da uleína sobre a adesão espontânea, GRN foram expostos à concentrações crescentes ( $10^{-2}$  – 10 µg/ml) de uleína e sua capacidade de interagir com o plástico avaliada.

Conforme ilustrado na Figura 9, o alcalóide não demonstrou interferir com a adesão espontânea de GRN a superfícies artificiais em todas as concentrações observadas.

#### 4.6 EFEITO DA ULEÍNA SOBRE A ADESÃO DE LEUCÓCITOS HUMANOS A PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR

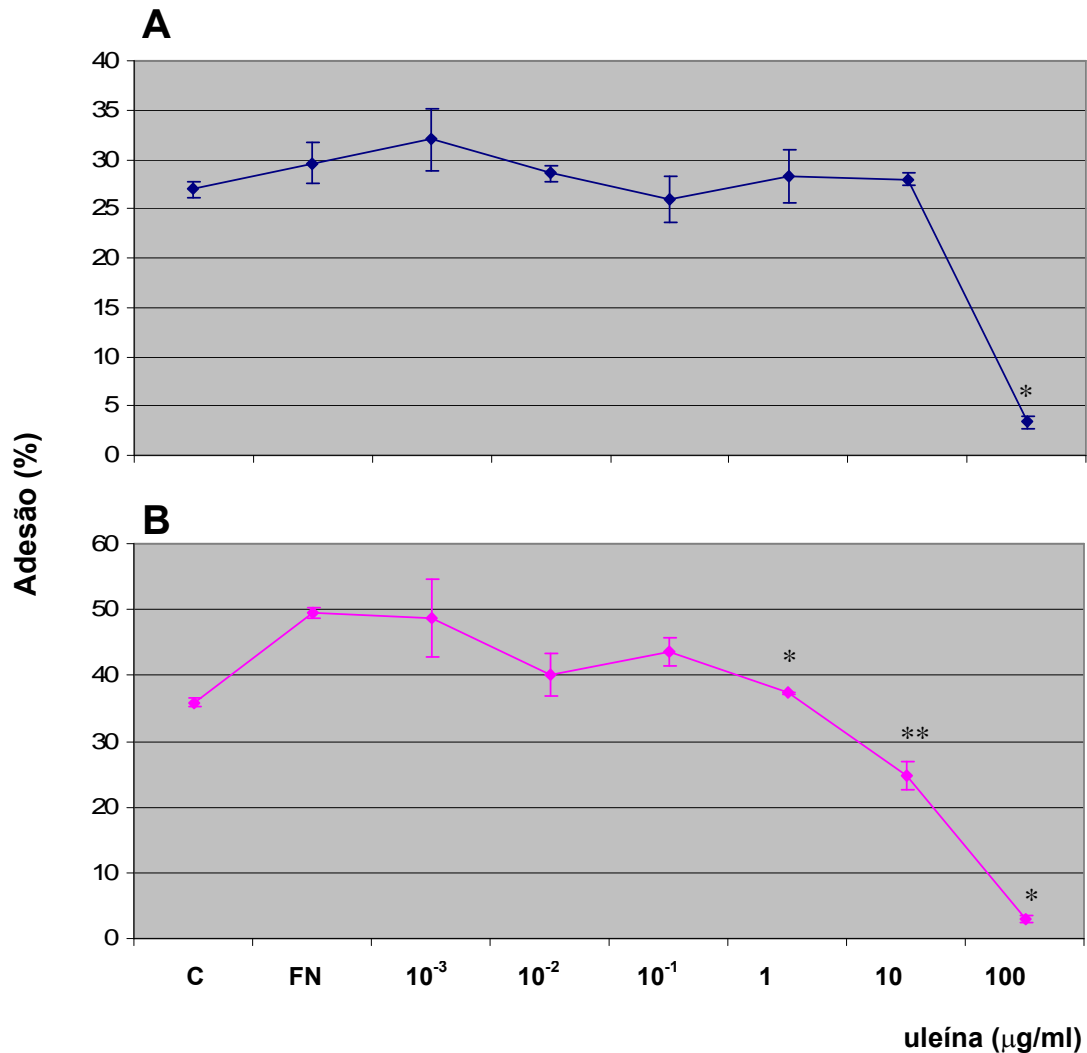
Após observar-se que a uleína é desprovida de ação tóxica sobre leucócitos humanos e não interfere na propriedade de adesão natural de, pelo menos, granulócitos humanos a superfícies artificiais, investigou-se sua influência sobre a capacidade de interação de leucócitos com proteínas da matriz extracelular. Para tanto, avaliou-se sua capacidade em interferir com a adesão de GRN e MNC à FN e VN imobilizadas sobre a base de frascos de cultura.



**Figura 9. Efeito da uleína sobre a capacidade adesiva espontânea de leucócitos humanos.** Granulócitos isolados de sangue periférico por centrifugação com gradiente de densidade foram incubados na presença das concentrações indicadas de uleína, durante 1h a 37°C. Cada ponto representa a percentagem média  $\pm$  EPM de células aderentes de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata.

Tratamento de MNC com concentrações crescentes de uleína ( $10^{-3}$  a  $100\mu\text{g/ml}$ ) não alterou seu comportamento adesivo à FN até a concentração de  $10\mu\text{g/ml}$  (Figura 10-A). Entretanto, significativa inibição foi observada a  $100\mu\text{g/ml}$ . Ao se avaliar essas células com azul de tripano, somente  $52,4 \pm 1,3\%$  ( $n = 3$ ) mostraram-se viáveis, confirmando os resultados anteriores que já haviam demonstrado toxicidade da uleína para essa população nesta concentração. Para as

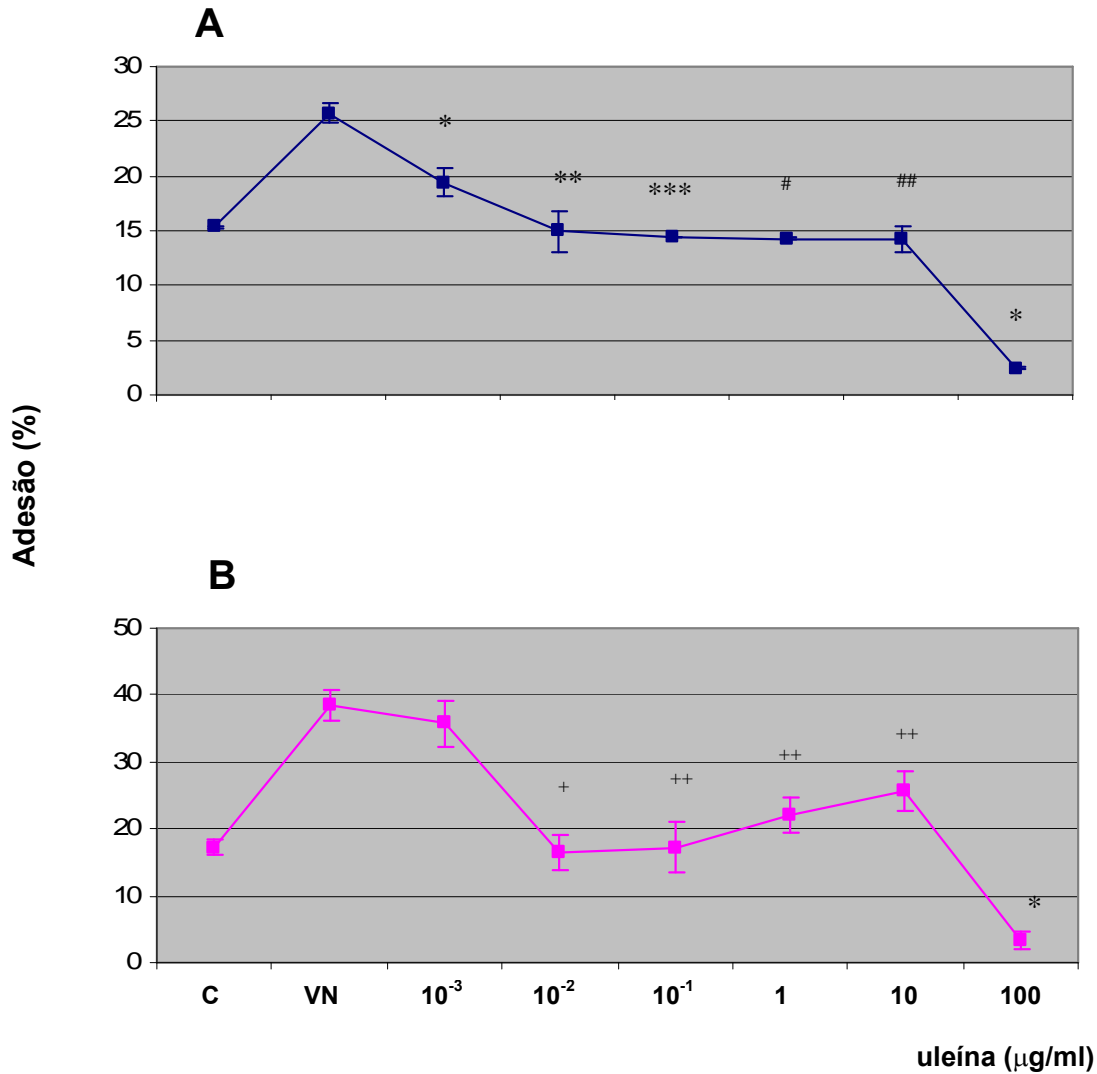
concentrações de 1 a 10  $\mu\text{g/ml}$  de uleína, observou-se  $93 \pm 2,7$  e  $90,5 \pm 1,2\%$  ( $n=3$ , para ambos), respectivamente de viabilidade.



**Figura 10. Efeito da uleína sobre a capacidade adesiva de leucócitos humanos à fibronectina.** Mononucleares (A) e granulócitos (B) isolados de sangue periférico por centrifugação com gradiente de densidade, foram incubados na presença das concentrações indicadas de uleína e induzidos a aderir à fibronectina imobilizada na base de frascos de cultura por 1h a 37°C. Cada ponto representa a percentagem média  $\pm$  EPM de células aderentes de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata. (\*)  $p < 0,004$  e (\*\*)  $p < 0,01$  em relação às células não tratadas (FN) (teste t).

Em contraste ao observado para MNC, efeito anti-adesivo de GRN à FN na presença de uleína foi evidente (Figura 10-B), sendo este efeito inclusive

significativo nas concentrações de 1 e 10  $\mu\text{g/ml}$ , com somente  $37,3 \pm 0,2\%$  ( $n = 3$ ;  $p < 0,004$ ) e  $24,8 \pm 2,2\%$  ( $n=3$ ;  $p < 0,01$ ), respectivamente, de células aderidas recuperadas. Importante ressaltar que este efeito não foi decorrente de toxicidade, pois  $93,3 \pm 1,4\%$  ( $n=3$ ) e  $89,7 \pm 0,7\%$  ( $n=3$ ) dos GRN mostraram-se viáveis.



**Figura 11. Efeito da oleína sobre a capacidade adesiva de leucócitos humanos à vitronectina.** Mononucleares (A) e granulócitos (B) isolados de sangue periférico por centrifugação com gradiente de densidade foram incubados na presença das concentrações indicadas de oleína e induzidas a aderir à vitronectina imobilizada na base de frascos de cultura por 1h a 37°C. Cada ponto representa a percentagem média  $\pm$  EPM de células aderentes de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata. (\*)  $p < 0,03$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,003$ ; (#)  $p < 0,0004$ ; (##)  $p < 0,002$ ; (+)  $p < 0,04$  e (++)  $p < 0,05$  em relação às células não tratadas (VN) (teste t).

Ao investigar-se a capacidade da uleína em interferir com a adesão leucocitária à VN no mesmo modelo experimental, efeito inibitório para os MNC foi observado, porém sendo significativo já a partir de 0,001µg/ml de alcalóide, com somente  $19,4 \pm 1,3\%$  ( $n = 4$ ;  $p < 0,03$ ) de células aderidas (Figura 11-A). Para as concentrações de 0,01, 0,1, 1 e 10 µg/ml, observou-se um declínio discreto, dose-dependente e significativo em relação à população não tratada, do número de células presentes na fração aderente, com valores de, respectivamente,  $15,0 \pm 1,9$  ( $p < 0,01$ ),  $14,4 \pm 0,01$  ( $p < 0,003$ ),  $14,3 \pm 0,1$  ( $p < 0,0004$ ) e  $14,2 \pm 1,2\%$  ( $p < 0,002$ ), sendo  $n = 4$  para todos.

Semelhante ao observado para com a FN, a queda na adesão de MNC a VN observada na concentração de 100µg/ml foi resultante de toxicidade da uleína, onde o ensaio com azul de tripano revelou que somente  $39 \pm 0,5\%$  ( $n = 4$ ) das células encontravam-se viáveis, em contraste com as concentrações inferiores, que demonstraram viabilidade sempre superior a  $91,4 \pm 1,6\%$  ( $n = 4$ ).

Da mesma forma, inibição significativa na adesão de GRN à VN na presença de uleína foi observado (Figura 11-B), desde a concentração de 0,01µg/ml, ( $16,4 \pm 5,1\%$ ;  $n = 4$ ;  $p < 0,04$ ) até 10 µg/ml ( $25,7 \pm 5,8\%$ ;  $n = 4$ ;  $p < 0,05$ ), com as células mostrando viabilidade superior a 92,7%.

Diante de uma lesão celular, independentemente do agente agressor, uma série de modificações no tecido conjuntivo vascularizado ocorre, com acúmulo de líquidos e recrutamento de elementos celulares com funções específicas, particularmente granulócitos neutrófilos, ou polimorfonucleares, e macrófagos, ambos fagócitos por excelência, que objetivam a eliminação rápida do agente agressor e a reparação do tecido lesado, caracterizando a resposta inflamatória aguda (Cotran et al., 1994).

Das células com grande capacidade de responder a estímulos inflamatórios, destacam-se os GRN circulantes no sangue periférico. Dentre esses, há os neutrófilos, que constituem a população celular primária na defesa aguda contra vários tipos de microorganismos, acumulando-se rapidamente no sítio invasivo ou de lesão. Em contraste com a reação aguda, a inflamação crônica caracteriza-se por

uma maior infiltração de MNC, incluindo macrófagos, linfócitos e plasmócitos, como reflexo de lesão tecidual persistente (Cotran et al., 1994).

O recrutamento só ocorre quando as células podem aderir às proteínas da matriz extracelular. Estudos recentes têm demonstrado que os mecanismos moleculares que recrutam os diferentes tipos de leucócitos para as áreas inflamadas são similares (Mackai e Rosen, 2000). Experimentos também mostram que a adesão, a transmigração e a locomoção de leucócitos envolvem a ativação, por ligantes específicos, de diferentes famílias de receptores presentes na superfície dessas células e na matriz extracelular (Bokoch, 1995; Dekker e Segal, 2000).

Muitas dessas funções são decorrentes da interação entre um ligante e receptores de integrinas das subfamílias  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , expressos tanto nos leucócitos circulantes como nas paredes dos vasos e do endotélio subjacente (Springer, 1990), e o estudo do padrão de sua presença na superfície celular é central para o entendimento de processos patológicos, uma vez que drogas que interferem nesse mecanismo têm aplicação potencial como agentes antiinflamatórios.

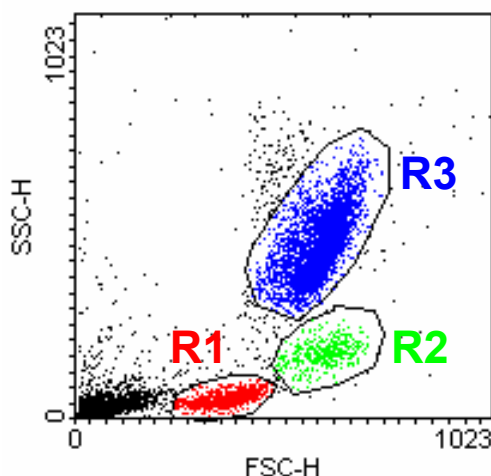
#### 4.7 EFEITO DA ULEÍNA SOBRE A PRESENÇA DE $\alpha_L\beta_2$ , $\alpha_4\beta_1$ E $\alpha_5\beta_1$ NA SUPERFÍCIE CELULAR DE LEUCÓCITOS HUMANOS

Tendo a uleína demonstrado interferir de forma significativa na adesão de leucócitos humanos à FN e à VN, investigou-se sua influência sobre a presença das integrinas  $\alpha_1\beta_4$  e  $\alpha_1\beta_5$  na superfície celular dos leucócitos. Para comparação, observou-se o seu efeito sobre LFA-1, uma integrina  $\beta_2$ , cujos sítios de interação celular não foram descritos até o momento nessas duas proteínas da matriz extracelular.

A citometria de fluxo é, neste contexto, um método ideal de análise, pois utiliza as características de tamanho e complexidade estrutural interna de cada célula como elementos discriminantes para sua análise, associadas à emissão de fluorescência por partículas a ela aderida, as quais podem ser, então, convenientemente selecionadas e analisadas. Assim, leucócitos presentes em alíquotas de sangue periférico de doadores normais foram marcados com anticorpos monoclonais específicos conjugados a fluorocromos e analisados por um citômetro,

após exposição, por uma e doze horas, sob contínua rotação, a 1 e 10 µg/ml de uleína.

A estratégia de seleção, ilustrada na Figura 12, foi empregada para separar as populações leucocitárias de interesse e, simultaneamente, minimizar interferências de debris e/ou outras células, às quais os anticorpos poderiam se ligar de forma inespecífica (Shapiro, 1985). Assim, janelas específicas foram traçadas, baseadas no tamanho (FSC – *forward side scatter*) e na complexidade interna (SSC – *side light scatter*) distintas para cada subpopulação de leucócitos (Civin e Loken, 1987), onde R1 especificou a janela para linfócitos (LIN); R2, para monócitos (MON) e R3, para granulócitos (GRN).



**Figura 12. Estratégia de seleção das diferentes populações de leucócitos para avaliação da presença de moléculas de adesão por citometria de fluxo.** Cada ponto representa uma célula detectada no sistema. As características de complexidade interna (**SSC-H**) e tamanho celular (**FSC-H**) foram utilizadas para distinguir cada população de leucócitos humanos e definir as regiões para a análise da expressão de moléculas de adesão. **R1** denota a região delimitada para linfócitos, **R2** para monócitos e **R3** para granulócitos.

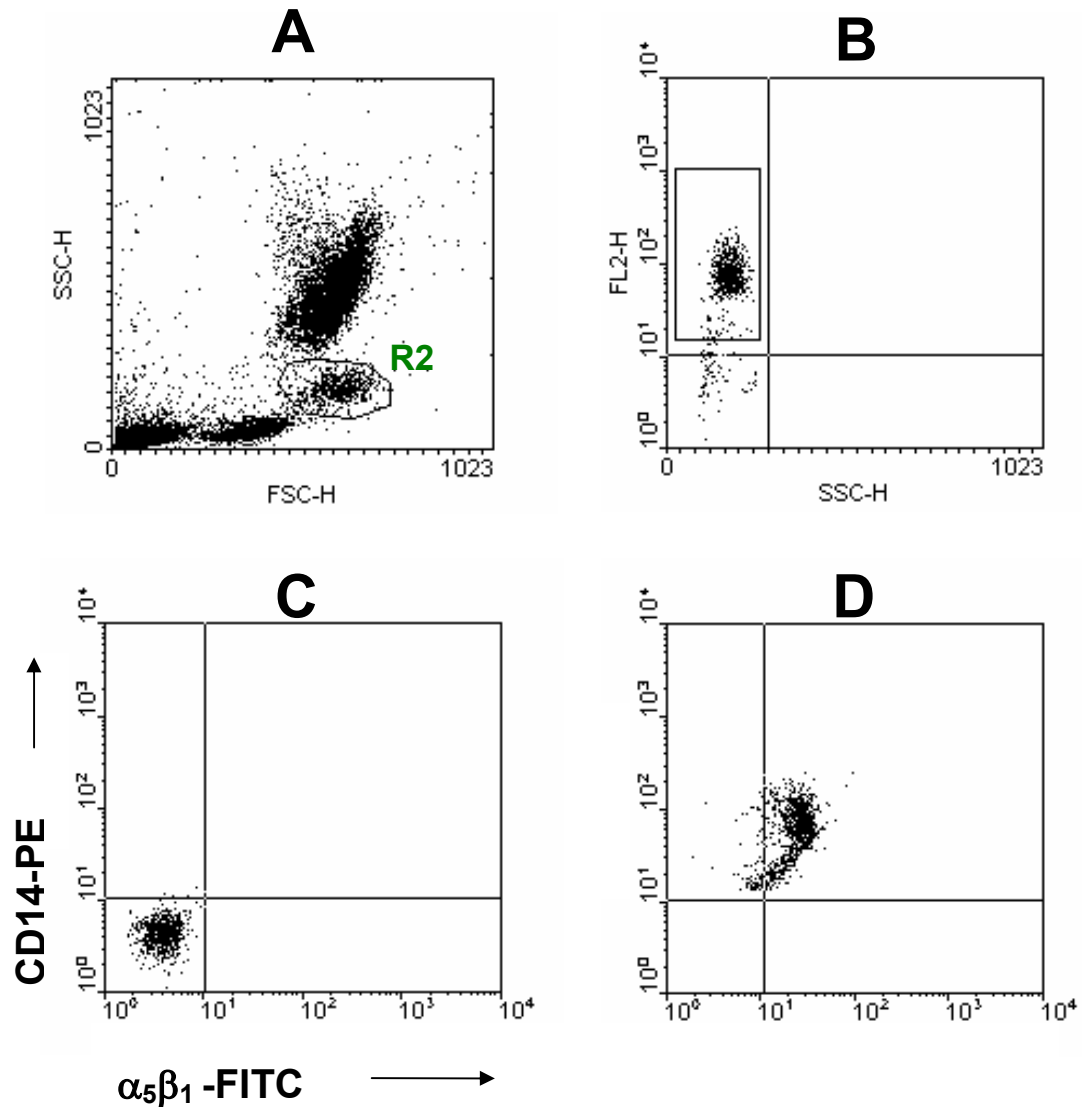
Analisando as características de tamanho e complexidade interna, linfócitos, monócitos e granulócitos, obtidos de amostras de voluntários sadios usadas neste trabalho, mostraram distribuição similar à inicialmente descrita por Civin e Loken



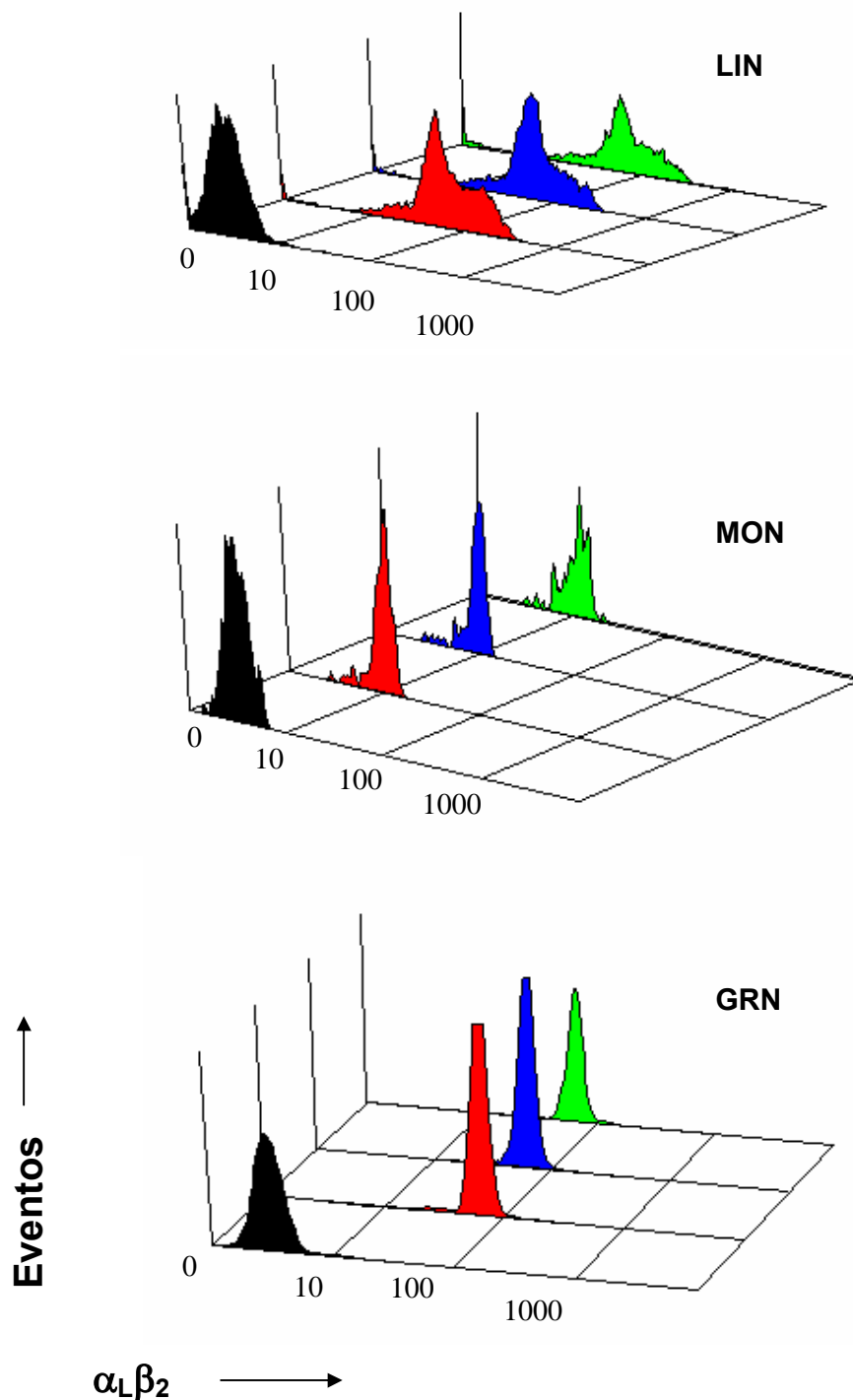
(Civin e Loken, 1987) e consagrada pelo uso em laboratórios de análises cíclicas de rotina.

Com o objetivo de melhor caracterizar a presença desses antígenos em monócitos, os quais, além de menos numerosos no sangue periférico, ocupam uma posição intermediária aos linfócitos e granulócitos (R2), estes foram marcados com anticorpos para  $\alpha_5\beta_1$  e  $\alpha_L\beta_2$  concomitantemente com anticorpos monoclonais para CD14, um marcador específico de monócitos (Szeberenyi et al., 2000). A estratégia utilizada para esta análise está demonstrada na Figura 13.

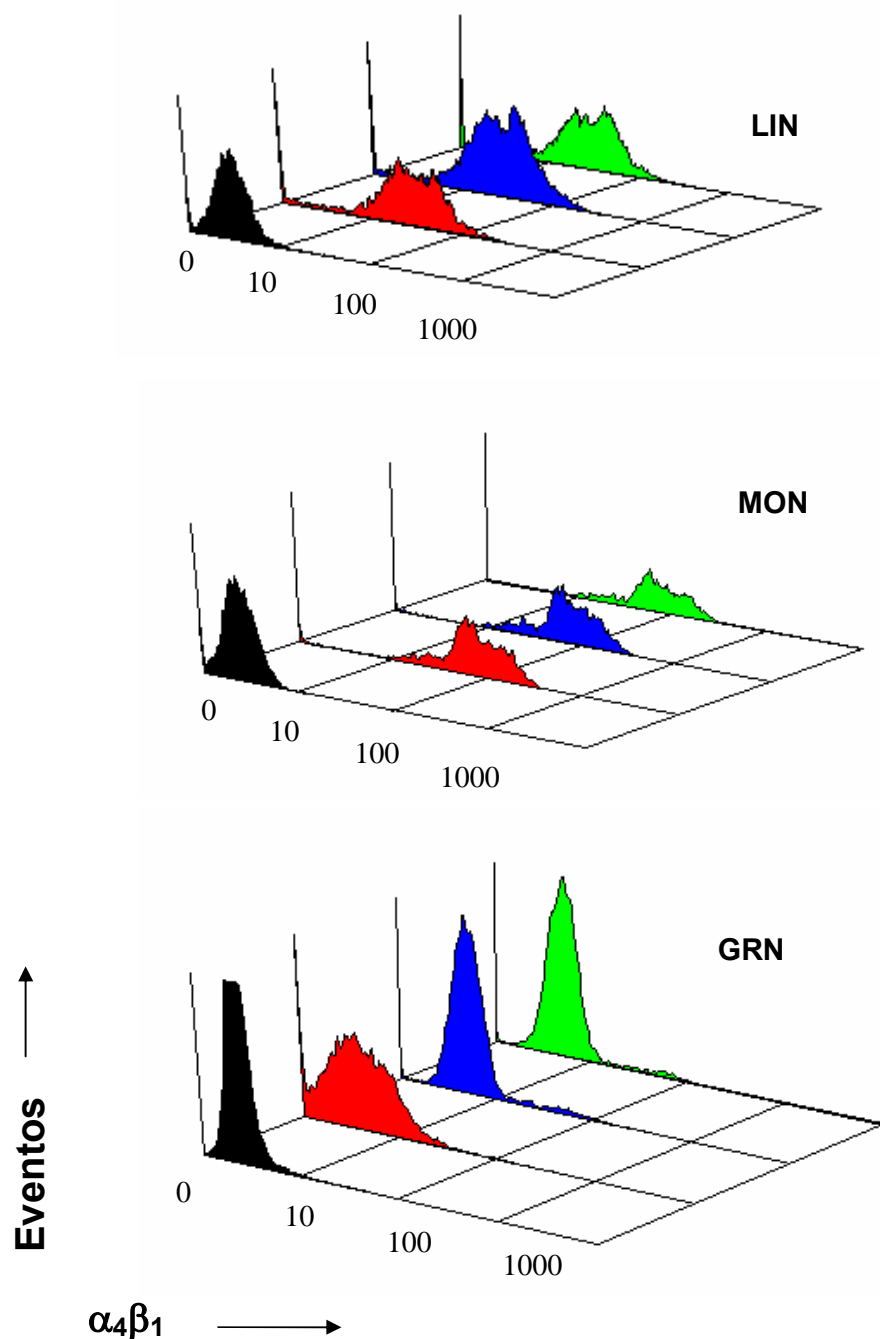
Exemplos de histogramas analisados para as integrinas  $\alpha_L\beta_2$ ,  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_5\beta_1$  em linfócitos, monócitos e granulócitos, antes e após 1 e 12 horas de exposição à uleína, estão demonstrados nas Figuras 14, 15 e 16, respectivamente.



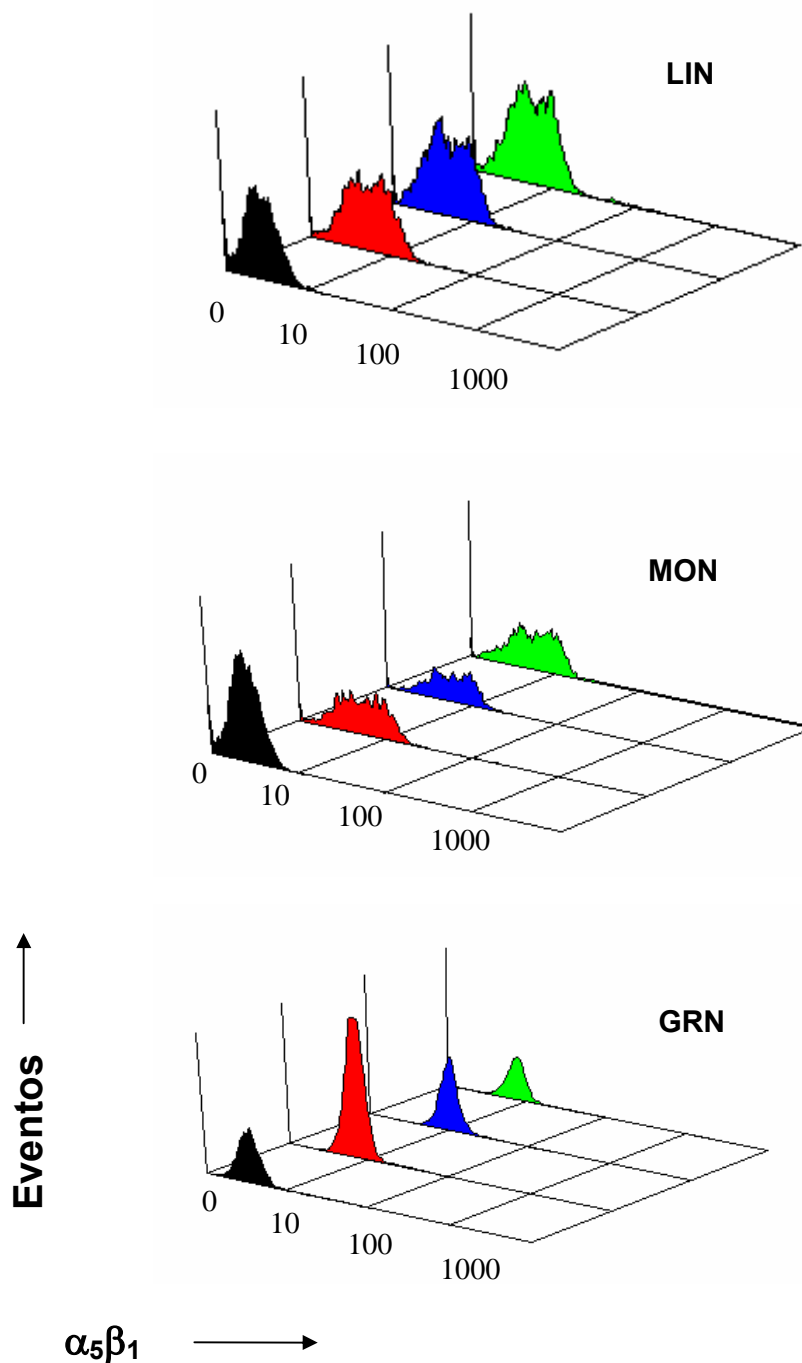
**Figura 13. Estratégia para análise da presença de moléculas de adesão na superfície celular de monócitos por citometria de fluxo.** Leucócitos de sangue periférico foram marcados concomitantemente com anticorpos monoclonais anti-CD14-PE e anti-  $\alpha_L\beta_2$ -FITC ou anti- $\alpha_5\beta_1$ -FITC. (A) Monócitos foram selecionados por suas características de tamanho (FSC-H) versus granularidade interna (SSC-H) e delimitados na região R2. Todas as células que, nesta população, expressaram CD14 foram selecionadas (B) e analisadas quanto à expressão de  $\alpha_L\beta_2$  ou  $\alpha_5\beta_1$  (D). C representa a população de monócitos não marcada, usada para definir a linha de detecção limite.



**Figura 14. Influência da uleína na presença de  $\alpha_L\beta_2$  na superfície celular de leucócitos humanos.** Leucócitos de sangue periférico de voluntários saudáveis foram expostos a 1 (■) e 10  $\mu\text{g/ml}$  (■) de uleína por 12 horas, a temperatura ambiente e sob contínua agitação. Em seguida, foram marcados com anticorpos monoclonais para  $\alpha_L\beta_2$  e analisados por citometria de fluxo. Os histogramas representam células que apresentam  $\alpha_L\beta_2$  nas regiões delineadas para linfócitos (LIN), monócitos (MON) e granulócitos (GRN), representativos de um experimento, onde histogramas negros (■) representam a população não marcada, usada para definir a linha limite de detecção (<10) e histogramas vermelhos representam o grupo controle, marcado com anticorpos (■), porém sem exposição à uleína.

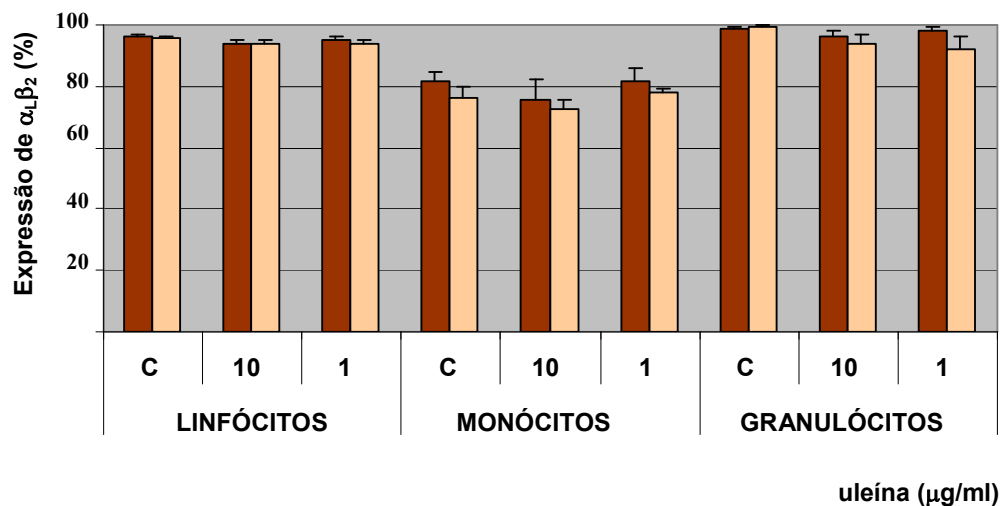


**Figura 15. Influência da uleína na presença de  $\alpha_4\beta_1$  na superfície celular de leucócitos humanos.** Leucócitos de sangue periférico de voluntários saudáveis foram expostos a 1 (■) e 10  $\mu\text{g/ml}$  (■) de uleína por 12 horas, a temperatura ambiente e sob contínua agitação. Em seguida, foram marcados com anticorpos monoclonais para  $\alpha_4\beta_1$  e analisados por citometria de fluxo. Os histogramas representam células que apresentam  $\alpha_4\beta_1$  nas regiões delineadas para linfócitos (LIN), monócitos (MON) e granulócitos (GRN), representativos de um experimento, onde histogramas negros (■) representam a população não marcada, usada para definir a linha limite de detecção (<10) e histogramas vermelhos representam o grupo controle, marcado com anticorpos (■), porém sem exposição à uleína.



**Figura 16. Influência da uleína na presença de  $\alpha_5\beta_1$  na superfície celular de leucócitos humanos.** Leucócitos de sangue periférico de voluntários sadios foram expostos a 1 (■) e 10  $\mu\text{g/ml}$  (■) de uleína por 12 horas, a temperatura ambiente e sob contínua agitação. Em seguida, foram marcados com anticorpos monoclonais para  $\alpha_5\beta_1$  e analisados por citometria de fluxo. Os histogramas representam células que apresentam  $\alpha_5\beta_1$  nas regiões delineadas para linfócitos (LIN), monócitos (MON) e granulócitos (GRN), representativos de um experimento, onde histogramas negros (■) representam a população não marcada, usada para definir a linha limite de detecção (<10) e histogramas vermelhos representam o grupo controle, marcado com anticorpos (■), porém Sem exposição à uleína.

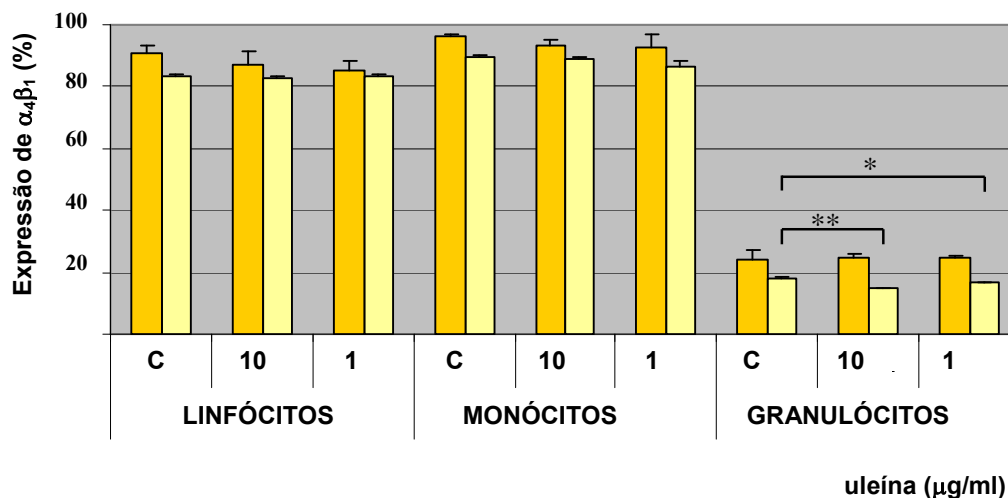
Como demonstrado na Figura 17, elevada presença de moléculas  $\alpha_L\beta_2$  foi observada em todas as populações leucocitárias analisadas, sendo que  $96,1 \pm 0,7\%$  ( $n = 3$ ) dos linfócitos circulantes apresentam  $\alpha_L\beta_2$ . Para monócitos e granulócitos, os valores encontrados foram de  $81,8 \pm 3,2\%$  ( $n = 3$ ) e  $98,6 \pm 0,7\%$  ( $n = 3$ ), respectivamente. Interessante se observar que, das subpopulações analisadas, a dos GRN é a que demonstrou uma presença mais homogênea, com picos de intensidade próximos de 80 (Figura 14), enquanto que, na dos linfócitos, pode-se observar uma distribuição bastante heterogênea, variando entre 10 e 600. O tratamento prévio com uleína, independente da concentração e do período de incubação, não alterou o nível de apresentação dessa integrina em nenhuma das populações analisadas.



**Figura 17. Influência da uleína na presença de  $\alpha_L\beta_2$  na superfície celular de leucócitos humanos.** Leucócitos de sangue periférico de voluntários sadios foram marcados com anticorpos monoclonais para  $\alpha_L\beta_2$  como descrito na sessão de Material e Métodos. Em alguns experimentos, essas células foram previamente expostas às concentrações indicadas de uleína por 1 (■) ou 12 horas (■). Em seguida, foram analisados por citometria de fluxo para presença de  $\alpha_L\beta_2$  usando as estratégias descritas nas Figuras 12 e 13, onde um mínimo de  $10^4$  células foi avaliado. As colunas representam a porcentagem média de expressão  $\pm 1$  EPM de 3 experimentos independentes.

Com relação à presença de  $\alpha_4\beta_1$ , demonstrada na Figura 18, para linfócitos e monócitos, os valores médios de expressão encontrados foram  $90,6 \pm 2,9$  e  $96,0 \pm$

1,0%, respectivamente. Em contraste, somente  $24,1 \pm 3,0\%$  foram os valores observados para granulócitos.

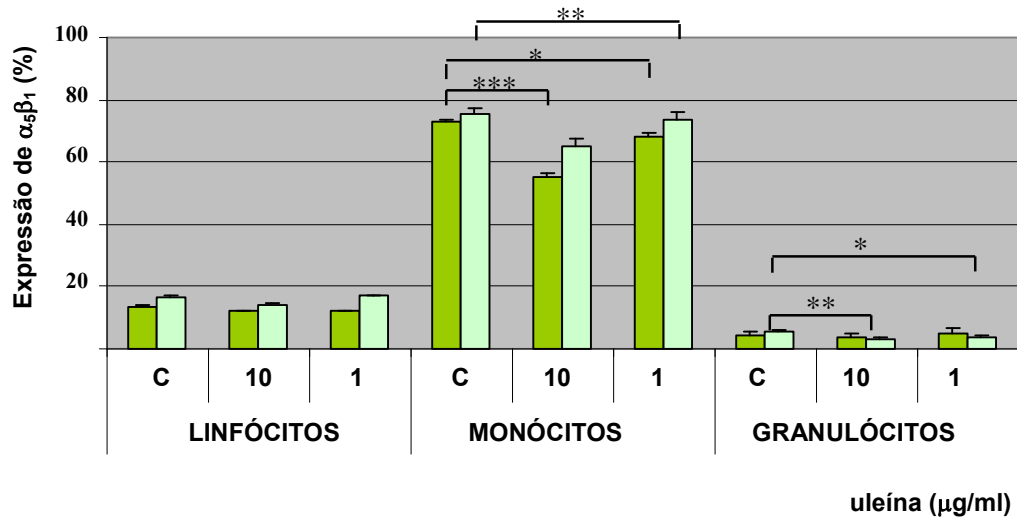


**Figura 18. Influência da uleína na presença de  $\alpha_4\beta_1$  na superfície celular de leucócitos humanos.** Leucócitos obtidos de sangue periférico de voluntários saudáveis foram marcados com anticorpos monoclonais para  $\alpha_4\beta_1$ , como descrito na sessão de Material e Métodos. Em alguns experimentos, essas células foram previamente expostas às concentrações indicadas de uleína por 1 (■) ou 12 horas (□). Em seguida, foram analisados por citometria de fluxo para presença de  $\alpha_4\beta_1$  usando as estratégias descritas nas Figuras 12 e 13, onde um mínimo de  $10^4$  células foi avaliado. As colunas representam a porcentagem média de expressão  $\pm 1$  EPM de 3 experimentos independentes. (\*)  $p < 0,03$ ; (\*\*)  $p < 0,003$  (teste  $t$ ).

Tratamento prévio com uleína, à semelhança de  $\alpha_L\beta_2$ , não alterou a apresentação de  $\alpha_4\beta_1$  nos mononucleares, independente da dose e do período de incubação. Entretanto, para granulócitos, níveis significativamente mais baixos foram observados após doze horas de incubação quando comparado ao grupo não tratado ( $18,0 \pm 0,2\%$ ), com  $16,6 \pm 0,4$  ( $n = 3$ ;  $p < 0,03$ ) e  $15 \pm 0,02\%$  ( $n = 3$ ;  $p < 0,003$ ) de expressão, para 1 e  $10\mu\text{g/ml}$  de uleína, respectivamente.

Em contraste com a relativa uniformidade de apresentação observada para  $\alpha_L\beta_2$  e  $\alpha_4\beta_1$ , a  $\alpha_5\beta_1$  mostrou-se variável dependendo da população estudada (Figura 19). Para linfócitos, observou-se somente  $13,6 \pm 0,6\%$  de presença. Para monócitos, os valores registrados foram de  $73,2 \pm 0,3\%$ . Para granulócitos, a apresentação de

$\alpha_5\beta_1$  mostrou-se variar muito de indivíduo para indivíduo e, como grupo, bastante baixa em relação à observada para os mononucleares, registrando um valor médio de apenas  $4,3 \pm 1,0\%$ .



**Figura 19. Influência da uleína na presença de  $\alpha_5\beta_1$  na superfície celular de leucócitos humanos.** Leucócitos obtidos de sangue periférico de voluntários sadios foram marcados com anticorpos monoclonais para  $\alpha_5\beta_1$ , como descrito na sessão de Material e Métodos. Em alguns experimentos, essas células foram previamente expostas às concentrações indicadas de uleína por 1 (■) ou 12 horas (□). Em seguida, foram analisados por citometria de fluxo para presença de  $\alpha_5\beta_1$  usando as estratégias descritas nas Figuras 12 e 13, onde um mínimo de  $10^4$  células foi avaliado. As colunas representam a porcentagem média de expressão  $\pm 1$  EPM de 3 experimentos independentes. (\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*)  $p < 0,02$ ; (\*\*\*)  $p < 0,0001$  (teste  $t$ ).

Tratamento com uleína não alterou os níveis de presença de  $\alpha_5\beta_1$  para linfócitos. Entretanto, para monócitos, queda significativa, dose-dependente, desses níveis foi observada quando se comparou à respectiva população não-tratada. Ou seja, valores de  $67,9 \pm 1,2\%$  ( $p < 0,01$ ) na concentração de  $1\mu\text{g/ml}$ , e de  $55,1 \pm 1,2\%$  ( $p < 0,0001$ ) a  $10\mu\text{g/ml}$ , após uma hora de incubação com uleína, foram obtidos nesta população (controle:  $73,2 \pm 0,3\%$ ). Após doze horas, os valores decaíram ainda mais, com  $64,8 \pm 2,7\%$  ( $p < 0,02$ ) para monócitos tratados com  $10\mu\text{g/ml}$ , sendo de  $75,6 \pm 1,5\%$  os níveis encontrados para o controle.

Em granulócitos, tanto para a concentração de  $1\mu\text{g/ml}$  como a de  $10\mu\text{g/ml}$ , observou-se diminuição significativa da presença de  $\alpha_5\beta_1$  somente após 12 horas de



incubação, quando somente  $3,6 \pm 0,4\%$  ( $p < 0,02$ ) e  $3,1 \pm 0,5\%$  ( $p < 0,01$ ), respectivamente, foram os níveis registrados (controle:  $5,6 \pm 0,4\%$ ).

Neste trabalho, combinou-se a especificidade de anticorpos monoclonais para  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_5\beta_1$  conjugados a fluorocromos com a metodologia de citometria de fluxo para se investigar a presença de moléculas de adesão na superfície celular de leucócitos humanos antes e após exposição a uleína.

Como já citado nesta dissertação, LFA-1 é uma integrina  $\beta_2$  normalmente presente nas subpopulações leucocitárias circulantes e está envolvida nos processos de adesão e migração dos leucócitos através do endotélio vascular e nos mecanismos primários envolvidos nas respostas inflamatória e imunitária (Larson et al., 1991).

De fato, níveis elevados de  $\alpha_L\beta_2$  foram encontrados em todas as subpopulações de leucócitos humanos analisados neste trabalho (Figura 17), particularmente em granulócitos e linfócitos, células primárias dos mecanismos básicos de defesa. Assim sendo, os níveis elevados de  $\alpha_L\beta_2$  nos diferentes tipos de leucócitos demonstrados vêm corroborar com a já conhecida ubíqua distribuição dessa molécula em leucócitos circulantes (Matsumoto et al., 1998; Tielemans et al., 1993; Zachee et al., 1994), independente de seu estado de ativação. Além disso, esta elevada presença persistiu mesmo após exposição, por 12 horas, a uleína, sugerindo que este alcalóide não tem a habilidade de influenciar sua apresentação.

Quando análise de  $\alpha_4\beta_1$  foi realizada com as mesmas frações leucocitárias, elevada presença foi encontrada em linfócitos e monócitos, confirmando outros relatos referentes à sua expressão constitutiva (Larson et al., 1991; St-Pierre et al., 1996; Stupack et al., 1991) e prévios resultados obtidos em nosso laboratório (Perini, 2003). Em contraste aos MNC, nossos resultados demonstraram níveis reduzidos desse receptor em granulócitos, também confirmando dados recentemente produzidos por Perini (2003) e relatados por outros (Kipps, 2001; Roussel e Gingras, 1997). A expressão de  $\alpha_4\beta_1$  em monócitos, linfócitos, basófilos e eosinófilos, um dos tipos de leucócitos que compõe a subpopulação de granulócitos, é conhecida (Hemler, 1990), porém sua expressão em neutrófilos, subtipo de leucócito majoritário na fração GRN, é baixa ou mesmo inexistente (Weber et al., 1996). Dessa forma, é possível que os baixos níveis de  $\alpha_4\beta_1$  detectados para a fração de GRN corresponda

aos eosinófilos presentes nesta fração (ver Tabela 2). Exposição a uleína por 12 horas, em contraste com o observado para  $\alpha_L\beta_2$ , reduziu ainda mais, e de forma significativa, a presença de  $\alpha_4\beta_1$  nesta população.

Com relação a  $\alpha_5\beta_1$ , um perfil diferenciado de apresentação, quando comparado às de  $\alpha_L\beta_2$  e  $\alpha_4\beta_1$ , pôde ser observado para os linfócitos, com níveis muito mais baixos, porém coerentes com os previamente descritos para linfócitos de sangue periférico de indivíduos sadios (Perini, 2003). Embora neste estudo os linfócitos foram avaliados como um único grupo, é interessante ressaltar que cerca de 70% dos linfócitos que trafegam no sangue periférico pertencem à linhagem T, cujos níveis de expressão semelhantes aos aqui observados para uma população não fracionada, independentemente do seu estado de ativação, já foram descritos (Avdalovic et al., 1993; Hamann et al., 1997; Hauzenberger e Sundqvist, 1993; Kasprzycka et al., 2000). Na população restante estão os linfócitos B (Stupack et al., 1991) e os NK (Gismondi et al., 1991), para os quais níveis similares de expressão de  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_5\beta_1$  aos obtidos também já foram relatados. Para os monócitos, os níveis elevados de expressão de  $\alpha_5\beta_1$  também foram consistentes com relatos anteriores (Canning et al., 2001; Trial et al., 1999) e confirmaram resultados recentemente obtidos em nosso laboratório (Perini, 2003). Tratamento com uleína, independente da concentração, levou à diminuição significativa de  $\alpha_5\beta_1$ , tanto em GRN como em MNC.

Esses resultados indicam que os efeitos da uleína em reduzir a adesidade de leucócitos humanos às proteínas FN e VN estão relacionados à sua interferência na apresentação das integrinas  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_5\beta_1$  na superfície celular, atividade esta até agora não relatada para este alcalóide.

#### 4.8 EFEITO DA ULEÍNA SOBRE A IMUNOMODULAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS

A capacidade que linfócitos T têm de serem ativados *in vitro* e proliferar quando expostos a mitógenos tem sido usada como um instrumento para avaliar o *status* funcional dessas células e tem aplicação prática em laboratórios de imunologia clínica, com o objetivo de diagnosticar indivíduos portadores de distúrbios relacionados à defesa imunológica. Tem, também, proporcionado ferramentas para

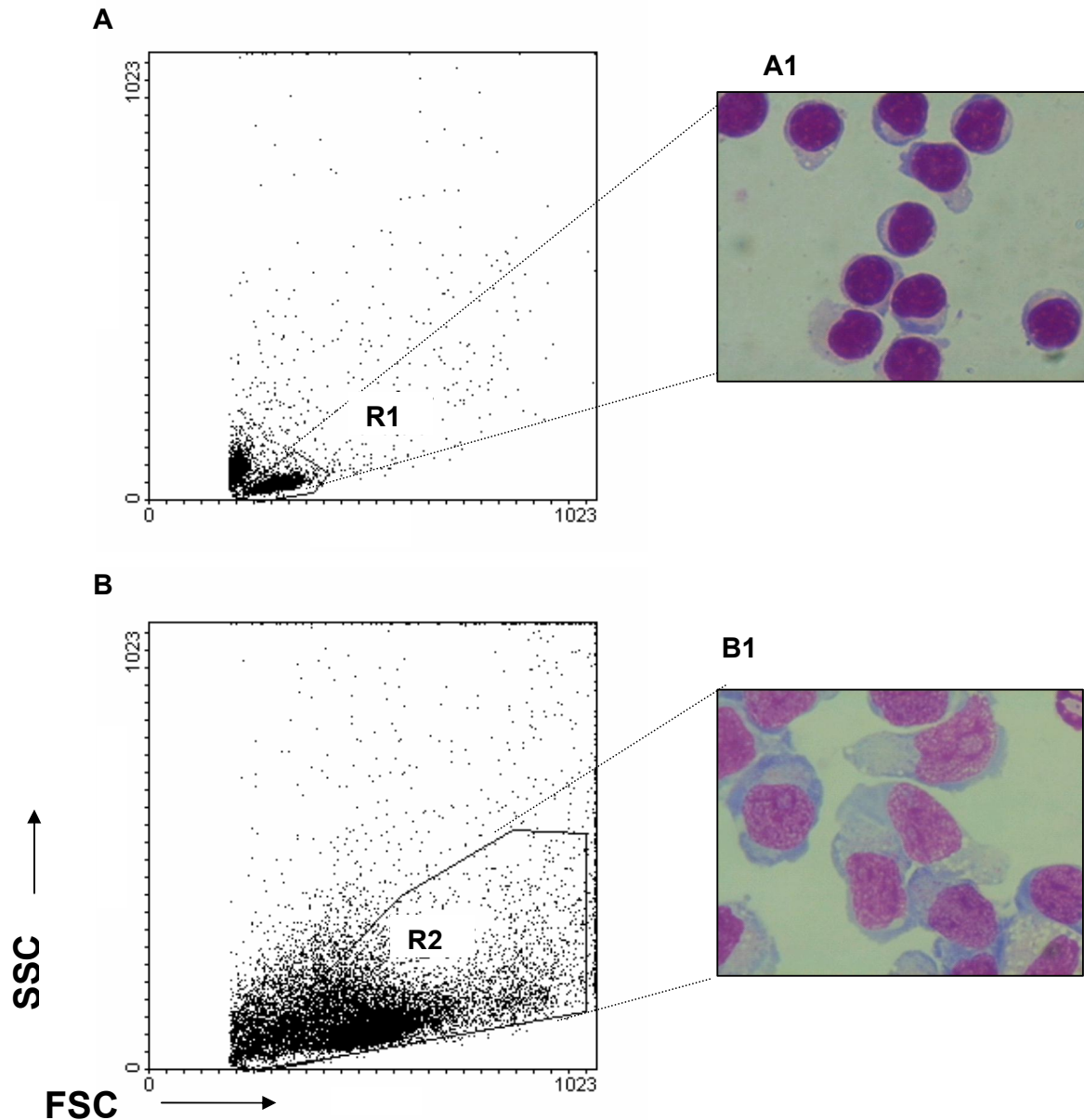
elucidar os mecanismos que envolvem as respostas imunológicas, assim como tornou-se útil para o estudo do efeito imunomodulador de várias substâncias.

Neste contexto, um dos meios de se estudar a ativação de células e, em particular, a de linfócitos, é pela alteração de sua morfologia, observada sob microscopia de imersão, em preparações fixadas e coradas. Linfócitos se caracterizam como células pequenas e arredondadas, com cerca de 10µm de diâmetro, elevada relação núcleo-citoplasmática; seu citoplasma é geralmente escasso, de coloração azul, sem a presença de granulação específica; seu núcleo arredondado é denso, com cromatina apresentando-se com agregados irregulares e a presença de estruturas semelhantes a nucléolos é eventual, porém mal definidos quando presentes. Linfócitos transformados pela ação de fitohemaglutinina apresentam-se com morfologia característica de células primitivas ou blásticas (linfoblastos), sendo células maiores do que linfócitos não-ativados, com cerca de 10 a 20µm de diâmetro, citoplasma azul escuro intenso, geralmente vacuolizado, com Complexo de Golgi desenvolvido, definido como área não corada ao redor do núcleo; este, por sua vez, se apresenta geralmente com cromatina delicada, presença de dois ou mais nucléolos proeminentes e delineados (Lee et al., 1999).

Muitas plantas utilizadas na medicina tradicional têm demonstrado eficiência em curar ou atenuar os efeitos da resposta imunológica. Neste trabalho, o potencial imunomodulador da uleína foi avaliado em dois momentos: primeiro, sobre a ativação celular, ou transformação blástica de MNC, pela análise morfológica dessas células em preparações coradas e pela porcentagem dessas células que se deslocaram da região R1 para a R2 em um citômetro, e, segundo, pelo seu efeito sobre o comportamento proliferativo dos MNC, descrito como IP, ambos após cultivo por 5 dias na presença de concentrações crescentes do alcalóide. Em paralelo, investigou-se seus efeitos sobre a proliferação de MNC na presença de fitohemaglutinina.

Neste momento, convém destacar que a estratégia utilizada para avaliar a transformação blástica e o potencial imunomodulador de MNC humanos por citometria de fluxo, ilustrada na Figura 20, baseou-se nos mesmos conceitos que distinguem cada população particular de células presente na medula óssea ou no sangue periférico de acordo com seu tamanho e complexidade interna, como já

detalhado no item 4.7, e no trabalho de Kristensen e colaboradores (1982), com algumas modificações (Kristensen et al., 1982).



**Figura 20. Estratégia para análise da atividade imunomodulatória de linfócitos por citometria de fluxo.** Os gráficos representam populações de mononucleares, onde as características de tamanho (FSC) e complexidade interna (SSC) foram utilizadas para distinguir cada população e definir as regiões para avaliação da proliferação de linfócitos do grupo controle (**A**) e do grupo exposto à fitohemaglutinina (**B**), ambas incubadas por 5 dias a 37° C e tensão de CO<sub>2</sub>. **R1** denota a região delimitada para linfócitos não ativados e **R2** delineia a região para linfócitos ativados, que se transformam em linfoblastos. Cada ponto representa uma célula detectada pelo sistema. Citocentrífugados preparados dessas populações após incubação e corados com May-Grunwald-Giemsa demonstraram morfologia predominante de linfócitos (**A1**) e blastos (**B1**), respectivamente (magnificação: 1000x).

Neste caso, a janela R1 foi delineada de forma subjetiva para especificar a população de linfócitos em seu estado basal (Figura 20-A), caracterizados por baixos FSC e SSC, correspondente a células de pequeno tamanho e complexidade citoplasmática simples (Civin e Loken, 1987). A janela R2 foi traçada, também de forma subjetiva, para caracterizar células ativadas, ou seja, aquelas que sofreram alteração morfológica, ou transformação blástica, conforme ilustrado na Figura 20-B, e se deslocaram para uma região de maior complexidade e tamanho (linfoblastos), porém incluindo a janela R1. A morfologia característica dessas duas populações está ilustrada em detalhes nos quadros A1 e B1 da Figura 20.

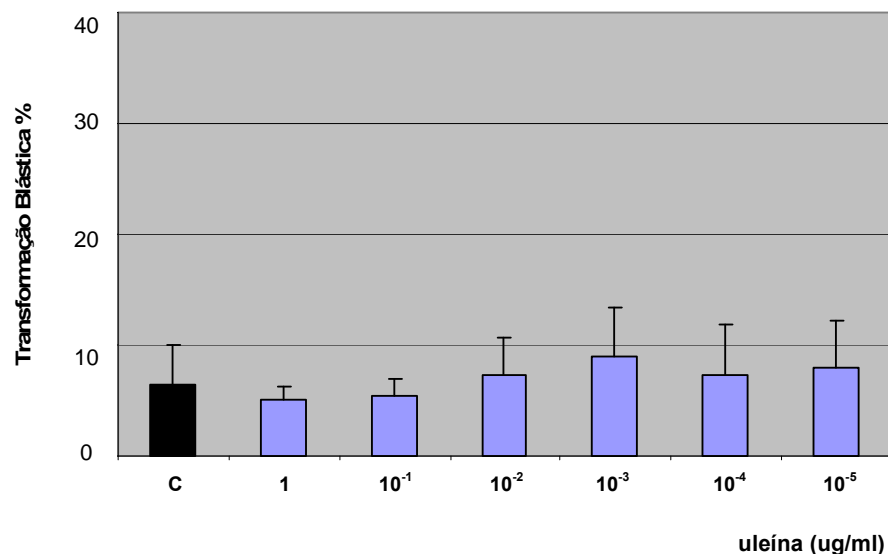
Ao avaliar-se a morfologia dos MNC, observou-se que, para o controle, somente 9,4% (n=6) das células detinham morfologia característica de linfoblastos, sendo o restante constituído por linfócitos. Em contraste, linfoblastos constituíram 85,6% (n=2) da população estimulada com PHA (Tabela 4).

**Tabela 4.** Influência da uleína na morfologia de linfócitos humanos cultivados, avaliada em citocentrifugados corados com May-Grunwald-Giemsa.

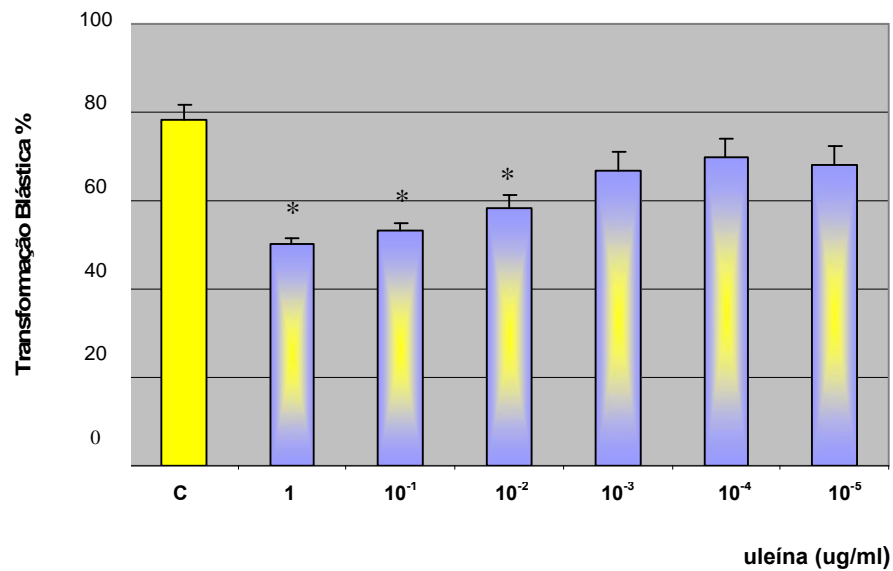
<b>MONONUCLEARES</b>	<b>Linfócitos (%)</b>	<b>Linfoblastos (%)</b>
<b>Controle</b>	90,6	9,4
<b>PHA</b>	14,4	85,6
<b>ULEÍNA (µg/ml)</b>		
<b>10<sup>-5</sup></b>	92,2	7,8
<b>10<sup>-4</sup></b>	95,4	4,6
<b>10<sup>-3</sup></b>	86,4	13,6
<b>10<sup>-2</sup></b>	89,5	10,5
<b>10<sup>-1</sup></b>	87,5	12,5
<b>1</b>	88,4	11,6
<b>10<sup>-5</sup> + PHA</b>	20,2	79,8
<b>10<sup>-4</sup> + PHA</b>	19,6	80,4
<b>10<sup>-3</sup> + PHA</b>	32,0	78,0
<b>10<sup>-2</sup> + PHA</b>	35,3	64,7
<b>10<sup>-1</sup> + PHA</b>	32,8	67,2
<b>1 + PHA</b>	45,7	54,3

Mononucleares obtidos de sangue periférico foram tratados com as concentrações indicadas de uleína e incubados a 37°C, por 5 dias, em atmosfera de CO<sub>2</sub>. Em alguns experimentos, meio de cultura contendo fitohemaglutinina (PHA) foi adicionado. A morfologia foi avaliada em citocentrifugados corados com May-Grunwald-Giemsa, sob imersão em microscópio comum. Cada valor representa a porcentagem média de células obtidas de dois experimentos, onde um mínimo de 100 células por experimento foi observado.

Simultaneamente e confirmando estes resultados, na transformação blástica avaliada por citometria de fluxo, a porcentagem de células presentes na R2 para o controle foi de  $6,4 \pm 3,5\%$  (Figura 21), enquanto para a população estimulada por PHA (Figura 22) o valor encontrado foi de  $78,2 \pm 2,9\%$  ( $p < 2,2 \times 10^{-8}$ ).



**Figura 21. Efeito *in vitro* da uleína sobre a transformação blástica de linfócitos humanos.** Mononucleares obtidos de sangue periférico de voluntários sadios foram tratados com as concentrações indicadas de uleína e incubados a 37°C, por 5 dias, em atmosfera de CO<sub>2</sub>. Cada coluna representa a porcentagem média  $\pm$  EPM de células presentes na região R2, após subtração do número de células em R1, obtidos por citometria de fluxo (n=6). **C** denota a população não exposta ao alcalóide.

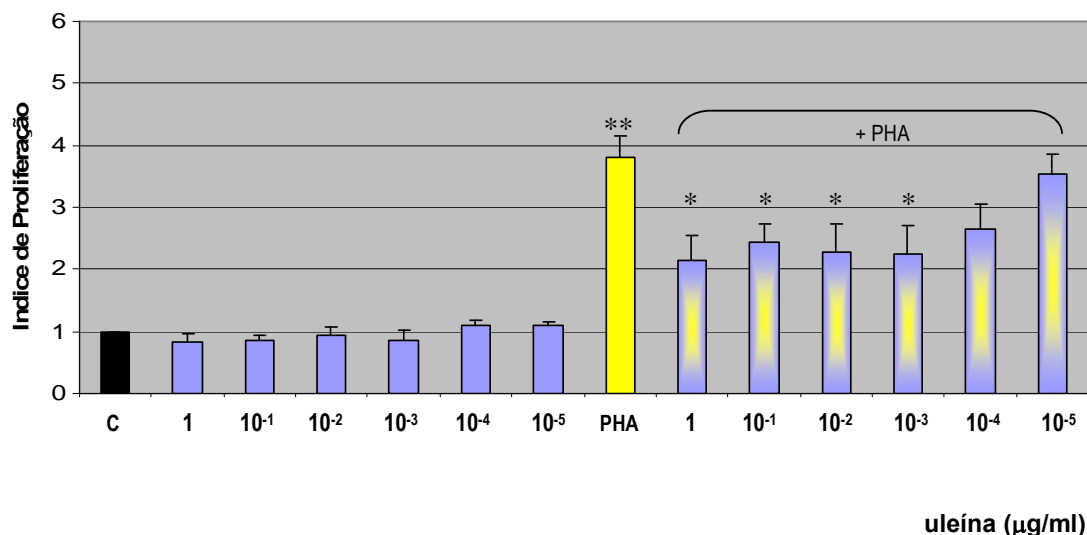


**Figura 22. Efeito *in vitro* da uleína sobre a transformação blástica de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina.** Mononucleares obtidos de sangue periférico de voluntários sadios foram tratados com as concentrações indicadas de uleína, na presença de fitohemaglutinina (PHA) e incubados a 37°C, por 5 dias, em atmosfera de CO<sub>2</sub>. Cada coluna representa a porcentagem média  $\pm$  EPM de células presentes na região R2, após subtração do número de células em R1, obtidos por citometria de fluxo (n=6). \* $p \leq 0,0002$  em relação ao controle (PHA).

Quando se avaliou a proliferação de linfócitos nas condições experimentais propostas (Figura 23), um índice de proliferação (IP) de  $3,81 \pm 0,3$  vezes maior em relação ao obtido para o controle não estimulado foi observado (n=6;  $p < 0,00001$ ).

Estes resultados indicaram e confirmaram que, de fato, a PHA é um potente ativador de linfócitos humanos, promovendo a transformação da maioria dos linfócitos a ela expostos os quais proliferam abundantemente como consequência, e que o sistema experimental utilizado permitiu recapitular os efeitos *in vitro* descritos para a PHA.

Quando as células foram incubadas apenas com o alcalóide uleína, nenhum efeito proliferativo foi observado, independente da concentração, com IP variando entre  $0,82 \pm 0,13$  e  $1,1 \pm 0,071$  (Figura 23).



**Figura 23. Efeito *in vitro* da uleína sobre a proliferação espontânea e a estimulada por fitohemaglutinina de linfócitos humanos.** Mononucleares obtidos de sangue periférico foram tratados com as concentrações indicadas de uleína e incubados a 37°C, por 5 dias, em atmosfera de CO<sub>2</sub>. Cada coluna representa a média ± EPM do índice de proliferação obtido da relação entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo na região R2 dos experimentos contendo uleína (■) e o número obtido no controle (■), de seis experimentos independentes, realizados em triplicata. Em alguns experimentos, adicionou-se meio de cultura contendo fitohemaglutinina (■) e uleína (■). (\*\*\*)  $p < 0,0001$  em relação a C, (\*)  $p < 0,03$  em relação a PHA.

Ou seja, nessas culturas, a maioria das células manteve-se na região R1, com predomínio de linfócitos. De fato, análise citométrica dessas populações demonstrou, para as concentrações de 10<sup>-5</sup> a 1 µg/ml, respectivamente, que somente 8 ± 4,3; 7,3 ± 4,6; 9 ± 4,5; 7,3 ± 3,3; 5,4 ± 1,6 e 5,1 ± 1,2%, de células foram detectadas em R2. Para o controle, o valor observado foi de 6,4 ± 3,5% (Figura 21), como já referido anteriormente.

Em contraste, nas culturas onde ambos, mitógeno e alcalóide, foram acrescentados, diminuição significativa da proliferação, nas concentrações de 1 a 10<sup>-3</sup> µg/ml, foi observada (Figura 23), com IP de 2,15 ± 0,38 ( $p < 0,01$ ), 2,45 ± 0,29 ( $p < 0,02$ ), 2,26 ± 0,46 ( $p < 0,03$ ) e 2,25 ± 0,44 ( $p < 0,02$ ), respectivamente, quando comparado ao valor obtido para o grupo estimulado somente com mitógeno (n=6). Nessas culturas, exceto na concentração de 1 µg/ml, a viabilidade celular manteve-



se sempre superior a 90%, conforme demonstrado na Tabela 5, excluindo a possibilidade de um efeito tóxico da uleína sobre as células.

**Tabela 5.** Efeito da uleína sobre a viabilidade de mononucleares humanos cultivados na presença de fitohemaglutinina.

ULEÍNA (µg/ml)	VIABILIDADE (%)
controle	72,7 ± 6,6
1	92,7 ± 1,2
10 <sup>-1</sup>	93,0 ± 2,5
10 <sup>-2</sup>	94,0 ± 1,2
10 <sup>-3</sup>	92,3 ± 2,0
10 <sup>-4</sup>	94,6 ± 2,6
10 <sup>-5</sup>	95,7 ± 0,2

Mononucleares obtidos de sangue periférico foram incubados com as concentrações indicadas de uleína a 37°C, por cinco dias, em atmosfera de CO<sub>2</sub> e na presença de fitohemaglutinina. Cada valor representa a percentagem média ± EPM de células viáveis, verificada pelo teste com azul de tripano, de pelo menos seis experimentos independentes, realizados em triplicata.

O acréscimo de uleína, nas concentrações de 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-1</sup> e 1 µg/ml, diminuiu significativamente a porcentagem de células na região R2, com valores de 58,2 ± 2,2; 53,1 ± 2,8 e 50,3 ± 2,7%, respectivamente (n=6; p<0,0002 em relação ao controle com PHA para todos), como demonstrado na Figura 22.

Esta coleção de resultados sugere que a uleína, por si só, tem uma habilidade muito reduzida em ativar MNC humanos e, como consequência, influenciar sua proliferação. Entretanto, quando essas células são expostas simultaneamente à ação da uleína e da PHA, a proliferação dessas células reduz-se significativamente, de forma dose-dependente. Ou seja, os dados aqui coletivamente apresentados sugerem que a uleína interfere nas etapas de ativação celular, alterando os mecanismos que antecedem sua proliferação. Como suporte desta afirmação, tem-se a morfologia apresentada pelos MNC expostos a uleína, os quais reteram a morfologia predominante de linfócitos, mesmo após estimulação com o mitógeno (Tabela 4). Além disso, a população simultaneamente exposta a uleína e a PHA mostrou viabilidade superior quando comparada àquela exposta somente a PHA.

Este aspecto é bastante interessante e sugere que a uleína também protegeu esta população dos efeitos estimulantes da PHA, em contraste com a população transformada, onde os blastos, por serem células em intensa atividade metabólica, com vistas à proliferação, ficaram expostos a influências externas.

Se, de fato, a uleína interfere nos mecanismos de ativação celular precedentes à proliferação, interessante seria, para esclarecer esta hipótese, mensurar os níveis de IL-2 no meio de cultura ou determinar os níveis de expressão de receptores para IL-2 ou, ainda, investigar a expressão de RNAm para esta citocina, pois, como descrito na introdução deste trabalho, uma etapa fundamental para a proliferação de linfócitos induzida por mitógenos é a síntese e secreção de IL-2 e seus receptores, que culmina na expansão proliferativa desta população.

Sabe-se que o influxo de  $\text{Ca}^{++}$  é central na ativação *in vitro* de linfócitos e parece ocorrer rapidamente após a interação do mitógeno PHA com receptores presentes na superfície de linfócitos humanos (Cooper, 1972). Assim, é possível que a uleína tenha inibido a proliferação de linfócitos por interferir na mobilização de  $\text{Ca}^{++}$  necessário para que este processo se realize. Esta afirmação encontra suporte nas evidências recentemente descritas para a fração alcaloídica rica em uleína preparada de cascas de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, onde observou-se redução significativa da resposta contrátil da musculatura lisa vascularizada do jejuno e da aorta de ratos induzida pela acetilcolina e fenilefrina (Rattmann et al., 2005), respectivamente, mecanismos estes dependentes de  $\text{Ca}^{++}$ . Além disso, o envolvimento de  $\text{Ca}^{++}$  na adesão celular é amplamente conhecido (Pelletier et al., 1996) e a uleína interferiu significativamente na adesão de leucócitos humanos a componentes da matriz extracelular pela diminuição da expressão de  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_5\beta_1$ .

Embora esses experimentos não permitam esclarecer se este alcalóide atua bloqueando o influxo de  $\text{Ca}^{++}$ , na sua mobilização ou, ainda, na sua utilização, o fato de se observar interferência significativa em modelos *in vitro* de imunomodulação, de adesão e de quimiotaxia faz da uleína um composto com relevante potencial antiinflamatório, o qual certamente deve ser mais profundamente investigado.

## 5. CONCLUSÃO

O objetivo deste trabalho foi investigar as atividades biológicas do alcalóide uleína, extraído e purificado de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson. Os dados contidos nesta dissertação revelaram alguns aspectos interessantes e inéditos sobre a uleína, dos quais se destacam:

- um potencial antiinflamatório, uma vez que demonstrou interferir com a adesão de leucócitos humanos à fibronectina e vitronectina purificadas de plasma humano e imobilizadas sobre plástico, pela diminuição da expressão dos receptores  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_5\beta_1$  expressos nessas células

- um potencial imunomodulatório, refletido na capacidade de inibir a proliferação de linfócitos humanos induzida por mitógeno, ao atuar nos mecanismos de ativação celular.

Os resultados obtidos e as informações deles derivadas sugerem alguns dos mecanismos de ação da uleína que devem ser mais bem explorados, a fim de estabelecer-se se a uleína poderá ser usado como uma nova alternativa terapêutica para o tratamento de doenças que envolvem as respostas inflamatória e imunitária.

## REFERÊNCIAS

Akama, T., K.M. Yamada, N. Seno, I. Matsumoto, I. Kono, H. Kashiwagi, T. Funaki e M. Hayashi. Immunological characterization of human vitronectin and its binding to glycosaminoglycans. *J Biochem (Tokyo)*. 100:1343-51. 1986.

Akiyama, S.K., K. Nagata e K.M. Yamada. Cell surface receptors for extracellular matrix components. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1031:91-110. 1990.

Akiyama, S.K., S.S. Yamada, W.T. Chen e K.M. Yamada. Analysis of fibronectin receptor function with monoclonal antibodies: roles in cell adhesion, migration, matrix assembly, and cytoskeletal organization. *J Cell Biol*. 109:863-75. 1989.

Akiyama, S.K., S.S. Yamada e K.M. Yamada. Characterization of a 140-kD avian cell surface antigen as a fibronectin-binding molecule. *J Cell Biol*. 102:442-8. 1986.

Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts e P. Walter. Molecular biology of the cell. Taylor and Francis Books, New York. 1463 pp. 2002.

Alonso, J.R. Tratado de Fitomedicina: Bases Clínicas e Farmacológicas. Isis Ediciones SRL, Buenos Aires. 1998.

Altroff, H., C.F. van der Walle, J. Asselin, R. Fairless, I.D. Campbell e H.J. Mardon. The eighth FIII domain of human fibronectin promotes integrin alpha5beta1 binding via stabilization of the ninth FIII domain. *J Biol Chem*. 276:38885-92. 2001.

Anderson, C.M., R.S. Walters e G.N. Hortobagyi. Mediastinitis related to probable central vinblastine extravasation in a woman undergoing adjuvant chemotherapy for early breast cancer. *Am J Clin Oncol*. 19:566-8. 1996.

Arnaout, M.A. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules (CD18/CD11). *Blood*. 75:1037-1050. 1990a.

Arnaout, M.A. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood*. 75:1037-50. 1990b.

Avdalovic, M., D. Fong e B. Formby. Adhesion and costimulation of proliferative responses of human gamma delta T cells by interaction of VLA-4 and VLA-5 with fibronectin. *Immunol Lett*. 35:101-8. 1993.

Barkalow, F.J. e J.E. Schwarzbauer. Localization of the major heparin-binding site in fibronectin. *J Biol Chem*. 266:7812-8. 1991.

Barnes, D.W. e J. Silnutzer. Isolation of human serum spreading factor. *J Biol Chem*. 258:12548-52. 1983.

Ben-Baruch, A., D.F. Michiel e J.J. Oppenheim. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 270:11703-6. 1995.

Berger, S.L. Lymphocytes as resting cells. *In* Methods in enzymology. Vol. 57. W.B. Jakoby e I.H. Pastan, editors. Academic Press, New York. 486-94. 1979.

Blystone, S.D., I.L. Graham, F.P. Lindberg e E.J. Brown. Integrin alpha v beta 3 differentially regulates adhesive and phagocytic functions of the fibronectin receptor alpha 5 beta 1. *J Cell Biol*. 127:1129-37. 1994.

Boettiger, D., F. Huber, L. Lynch e S. Blystone. Activation of alpha(v)beta3-vitronectin binding is a multistage process in which increases in bond strength are dependent on Y747 and Y759 in the cytoplasmic domain of beta3. *Mol Biol Cell*. 12:1227-37. 2001a.

Boettiger, D., L. Lynch, S. Blystone e F. Huber. Distinct ligand-binding modes for integrin alpha(v)beta(3)-mediated adhesion to fibronectin versus vitronectin. *J Biol Chem*. 276:31684-90. 2001b.

Bokoch, G.M. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood*. 86:1648-1660. 1995.

Brostoff, J. e D.K. Male. Clinical immunology - an illustrated outline. Mosby, London. 132. 1994.

Brown, E.J. e J.L. Goodwin. Fibronectin receptors of phagocytes. Characterization of the Arg-Gly-Asp binding proteins of human monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med*. 167:777-93. 1988.

Buchi, G. e E.W. Warnhoff. The Structure of Uleine. *Journal of the American Chemical Society*. 81:4433-4434. 1959.

Büchi, G. e E.W. Warnhoff. The Structure of Uleine. *Journal of the American Chemical Society*. 81:4433-4434. 1959.

Buck, C.A. e A.F. Horwitz. Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. *Annu Rev Cell Biol*. 3:179-205. 1987.

Burgermeister, E., J. Endl e W.V. Scheuer. Activation of cytosolic phospholipase A2 in human T-lymphocytes involves inhibitor-kappaB and mitogen-activated protein kinases. *Eur J Pharmacol*. 466:169-80. 2003.

Burridge, K., K. Fath, T. Kelly, G. Nuckolls e C. Turner. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol.* 4:487-525. 1988.

Buss, A.D. e R.D. Waigh. Burger's medical chemistry and drug discovery. In Natural compounds as leads for new pharmaceuticals. John Wiley & Sons, Oxford. 983-1033 pp. 1995.

Canning, M.O., K. Grotenhuis, M. De Haan-Meulman, H.J. De Wit, A. Berghout e H.A. Drexhage. An abnormal adherence of monocytes to fibronectin in thyroid autoimmunity has consequences for cell polarization and the development of veiled cells. *Clin Exp Immunol.* 125:10-8. 2001.

Cantrell, D.A. e K.A. Smith. The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. *Science.* 224:1312-6. 1984.

Carlos, T.M. e J.M. Harlan. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* 84:2068-2101. 1994.

Carlson, R.W., R.F. Dorfman e B.I. Sikic. Successful treatment of metastatic thymic carcinoma with cisplatin, vinblastine, bleomycin, and etoposide chemotherapy. *Cancer.* 66:2092-4. 1990.

Cassatela, M.A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today.* 16:21-26. 1995.

Civin, C.I. e M.R. Loken. Cell surface antigens on human marrow cells: dissection of hematopoietic development using monoclonal antibodies and multiparameter flow cytometry. *Int J Cell Cloning.* 5:267-88. 1987.

Clark, B.R., J.T. Gallagher e T.M. Dexter. Cell adhesion in the stromal regulation of haemopoiesis. *Bailliere's Clinical Haematology.* 5:619-652. 1992.

Clements, J.M., P. Newham, M. Shepherd, R. Gilbert, T.J. Dudgeon, L.A. Needham, R.M. Edwards, L. Berry, A. Brass e M.J. Humphries. Identification of a key integrin-binding sequence in VCAM-1 homologous to the LDV active site in fibronectin. *J Cell Sci.* 107 ( Pt 8):2127-35. 1994.

Coimbra, R. Manual de fitoterapia. CEJUP, Belém. 22-23 pp. 1994.

Colognato, H. e P.D. Yurchenco. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn.* 218:213-34. 2000.

Cooper, H.L. Studies on RNA metabolism during lymphocyte activation. *Transplant Rev.* 11:3-38. 1972.

Cordell, G.A. Introduction to alkaloids: A biogenetic approach. John Wiley & Sons, New York. 1055 pp. 1981.

Corrêa, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro. 1952.

Cotran, R.S., V. Kumar e S.L. Robbins. Pathologic basis of disease. W.B. Saunders Co, Philadelphia. 1400 pp. 1994.

Dahlback, B. e E.R. Podack. Characterization of human S protein, an inhibitor of the membrane attack complex of complement. Demonstration of a free reactive thiol group. *Biochemistry*. 24:2368-74. 1985.

Datta, A., F. Huber e D. Boettiger. Phosphorylation of beta3 integrin controls ligand binding strength. *J Biol Chem*. 277:3943-9. 2002.

Dekker, L.V. e A.W. Segal. Signals to move cells. *Science*. 287:982-985. 2000.

Dietrich, C.P. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. *Braz J Med Biol Res*. 17:5-15. 1984.

Doherty, D.E., P.M. Henson e R.A. Clark. Fibronectin fragments containing the RGDS cell-binding domain mediate monocyte migration into the rabbit lung. A potential mechanism for C5 fragment-induced monocyte lung accumulation. *The Journal of Clinical Investigation*. 86:1065-75. 1990.

Duke, J.A. Promising Phytomedicinals. Timber Press, Portland. 491-498 pp. 1990.

Durig, J., D.W. E.A., C. Kasper, M.A. Cross, J. Chang, N.G. Testa e C.M. Heyworth. Expression of macrophage inflammatory protein-1 receptors in human CD34(+) hematopoietic cells and their modulation by tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Blood*. 92:3073-3081. 1998.

Engel, J. e D.J. Prockop. The zipper-like folding of collagen triple helices and the effects of mutations that disrupt the zipper. *Annu Rev Biophys Chem*. 20:137-52. 1991.

Engvall, E. e E. Ruoslahti. Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int J Cancer*. 20:1-5. 1977.

Farmacopeia Brasileira. Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil. Companhia Editora Nacional, São Paulo. 1929.

Faull, R.J., N.L. Kovach, J.M. Harlan e M.H. Ginsberg. Affinity modulation of integrin alpha 5 beta 1: regulation of the functional response by soluble fibronectin. *J Cell Biol.* 121:155-62. 1993.

Ferguson, T.A., H. Mizutani e T.S. Kupper. Two integrin-binding peptides abrogate T cell-mediated immune responses *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 88:8072-8076. 1991.

Feske, S., R. Draeger, H.H. Peter, K. Eichmann e A. Rao. The duration of nuclear residence of NFAT determines the pattern of cytokine expression in human SCID T cells. *J Immunol.* 165:297-305. 2000.

Finau, J., M. Anguinoni, J.E.S. Santos, M.R. Terluk, C.A.M. Santos, L. Rieck e M.C.A. Marques. *In XIV Reunião Anual da Federação, Caxambu-Brasil.* 1996.

Franca, O.O., R.T. Brown e C.A. Santos. Uleine and demethoxyaspidospermine from the bark of *Plumeria lancifolia*. *Fitoterapia.* 71:208-10. 2000.

Fuquay, J.I., D.T. Loo e D.W. Barnes. Binding of *Staphylococcus aureus* by human serum spreading factor in an *in vitro* assay. *Infect Immun.* 52:714-7. 1986.

Gahmberg, C.G., L. Valmu, L. Tian, P. Kotovuori, S. Fagerholm, A. Kotovuori, C. Kantor e T. Hilden. Leukocyte adhesion - a fundamental process in leukocyte physiology. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 32:511-517. 1999.

Gailit, J. e R.A. Clark. Wound repair in the context of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol.* 6:717-25. 1994.

Gaines, H., L. Andersson e G. Biberfelds. A new method for measuring lymphoproliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 195:63-72. 1996.

Gaskell, A.J. e J.A. Joule. Structure of uleine: relative stereochemistry. *Chemistry and Industry*:1089. 1967.

Gebb, C., E.G. Hayman, E. Engvall e E. Ruoslahti. Interaction of vitronectin with collagen. *J Biol Chem.* 261:16698-703. 1986.

Gery, I., R.K. Gershon e B.H. Waksman. Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. *J Exp Med.* 136:128-42. 1972.

Gery, I. e B.H. Waksman. Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediator(s). *J Exp Med.* 136:143-55. 1972.



Gismondi, A., S. Morrone, M.J. Humphries, M. Piccoli, L. Frati e A. Santoni. Human natural killer cells express VLA-4 and VLA-5, which mediate their adhesion to fibronectin. *J Immunol.* 146:384-92. 1991.

Grabley, S. e R. Thiericke. Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 64:101-54. 1999.

Greaves, M. e G. Janossy. Elicitation of selective T and B lymphocyte responses by cell surface binding ligands. *Transplant Rev.* 11:87-130. 1972.

Hamann, D., P.A. Baars, M.H. Rep, B. Hooibrink, S.R. Kerkhof-Garde, M.R. Klein e R.A. van Lier. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med.* 186:1407-18. 1997.

Hamel, E. Antimitotic natural products and their interactions with tubulin. *Med Res Rev.* 16:207-31. 1996.

Hauzenberger, D. e K.G. Sundqvist. Fibronectin at the lymphocyte surface. Evidence for activation-dependent binding to VLA4 and VLA5 integrins. *Scand J Immunol.* 37:87-95. 1993.

Hay, E.D. Extracellular matrix. *J Cell Biol.* 91:205s-223s. 1981.

Hayes, A.J. e B. Markovic. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 40:535-43. 2002.

Hayman, E.G., M.D. Pierschbacher, Y. Ohgren e E. Ruoslahti. Serum spreading factor (vitronectin) is present at the cell surface and in tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:4003-7. 1983.

Hayman, E.G., M.D. Pierschbacher, S. Suzuki e E. Ruoslahti. Vitronectin--a major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum. *Exp Cell Res.* 160:245-58. 1985.

Hemler, M.E. VLA proteins in the integrin family: structures, functions and their role on leukocytes. *Annual Review of Immunology.* 8:365-400. 1990.

Hess, S., S.M. Kanse, C. Kost e K.T. Preissner. The versatility of adhesion receptor ligands in haemostasis: morpho-regulatory functions of vitronectin. *Thromb Haemost.* 74:258-65. 1995.

Hibbs, M.L., H. Xu, S.A. Stacker e T.A. Springer. Regulation of adhesion of ICAM-1 by the cytoplasmic domain of LFA-1 integrin beta subunit. *Science.* 251:1611-3. 1991.

Hirazumi, A., E. Furusawa, S.C. Chou e Y. Hokama. Immunomodulation contributes to the anticancer activity of morinda citrifolia (noni) fruit juice. *Process West Pharmacology Society*. 39:7-9. 1996.

Homolka, J., M.W. Ziegenhagen, K.I. Gaede, P. Entzian, G. Zissel e J. Muller-Quernheim. Systemic immune cell activation in a subgroup of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration*. 70:262-9. 2003.

Horton, M.A. The alpha v beta 3 integrin "vitronectin receptor". *Int J Biochem Cell Biol*. 29:721-5. 1997.

Hume, D.A. e M.J. Weidemann. Mitogenic lymphocyte transformation. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. 1980.

Hynes, R.O. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*. 48:549-54. 1987.

Hynes, R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 69:11-25. 1992.

Hynes, R.O. e K.M. Yamada. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol*. 95:369-77. 1982.

III, C.R. e E. Ruoslahti. Association of thrombin-antithrombin III complex with vitronectin in serum. *J Biol Chem*. 260:15610-5. 1985.

Janeway, C.A. Imunologia: o sistema imunológico na saúde e na doença. Artmed, Porto Alegre. 767 pp. 2002.

Jannosy, G. e M.F. Greaves. Lymphocyte activation. I. Response of T and B lymphocytes to phytomitogens. *Clinical experimental immunology*. 9:483. 1972.

Jeanloz, R.W. The nomenclature of mucopolysaccharides. *Arthritis Rheum*. 3:233-7. 1960.

Jenne, D. e K.K. Stanley. Molecular cloning of S-protein, a link between complement, coagulation and cell-substrate adhesion. *Embo J*. 4:3153-7. 1985.

Joule, J.A. e Djerassi, C. Alkaloid Studies. 45. Mass Spectrometry in Structural + Stereochemical Problems. 42. Some Aspects of Chemistry + Mass Spectrometry of Uleine. *Journal of the Chemical Society*. 2777. 1964.

Kasprzycka, M., M. Nowaczyk, A. Gorski, G. Korczak-Kowalsak, J. Wyzgal, M. Durlik, K. Rell, D. Klosowska e A. Chmura. Graft infiltrating t-lymphocyte expression of CD26, CD29, and CD49e molecules and genes. *Transplant Proc*. 32:1391-2. 2000.

Kipps, T.J. The cluster of differentiation antigens. *In* Hematology. McGraw -Hill, New York. 141-152. 2001.

Koch, M.O. e D. Coussens. Impact of methotrexate, vinblastine, adriamycin, and cisplatin chemotherapy in patients with lymph node metastases from transitional cell carcinoma of the lower urinary tract. *Semin Urol.* 11:14-9. 1993.

Komoriya, A., L.J. Green, M. Mervic, S.S. Yamada, K.M. Yamada e M.J. Humphries. The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. *J Biol Chem.* 266:15075-9. 1991.

Kornblihtt, A.R., K. Umezawa, K. Vibe-Pedersen e F.E. Baralle. Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *EMBO J.* 4:1755–1759. 1985.

Kristensen, F., C. Walker, F. Joncourt, F. Bettens e A.L. de Weck. Human lymphocyte proliferation. I. Correlation between activated and proliferating T-lymphocytes. *Immunol Lett.* 5:59-63. 1982.

Labat-Robert, J. Age-dependent remodeling of connective tissue: role of fibronectin and laminin. *Pathol Biol (Paris).* 51:563-8. 2003.

Lampugnani, M.G. e E. Dejana. Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Current Opinion in Cell Biology.* 9:674. 1997.

Larson, R.S., M.L. Hibbs e T.A. Springer. The leukocyte integrin LFA-1 reconstituted by cDNA transfection in a nonhematopoietic cell line is functionally active and not transiently regulated. *Cell Regulation.* 1:359-367. 1991.

Lawrence, M.B. e T.A. Springer. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell.* 65:859. 1991.

Leahy, D.J., I. Aukhil e H.P. Erickson. 2.0 A crystal structure of a four-domain segment of human fibronectin encompassing the RGD loop and synergy region. *Cell.* 84:155-64. 1996.

Lee, C., Q.H. Liu, B. Tomkowicz, Y. Yi, B.D. Freedman e R.G. Collman. Macrophage activation through CCR5- and CXCR4-mediated gp120-elicited signaling pathways. *J Leukoc Biol.* 74:676-82. 2003.

Lee, G.R., J. Foerster, J. Lukens, F. Paraskevas, J.P. Greer e G.M. Rodgers. Wintrobe's clinical hematology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2763 pp. 1999.

Lens, M.B. e T.G. Eisen. Systemic chemotherapy in the treatment of malignant melanoma. *Expert Opin Pharmacother.* 4:2205-11. 2003.

Liotta, L.A. Cancer cell invasion and metastasis. *Sci Am.* 266:54-9, 62-3. 1992.

Mackai, I.R. e F.S. Rosen. T-cell function and migration. *The New England Journal of Medicine.* 343:1020-1034. 2000.

Magnusson, M.K. e D.F. Mosher. Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18:1363-70. 1998.

Main, A.L., T.S. Harvey, M. Baron, J. Boyd e I.D. Campbell. The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions. *Cell.* 71:671-8. 1992.

Manabe, R., N. Ohe, T. Maeda, T. Fukuda e K. Sekiguchi. Modulation of cell-adhesive activity of fibronectin by the alternatively spliced EDA segment. *J Cell Biol.* 139:295-307. 1997.

Mans, D.R., A.B. da Rocha e G. Schwartzmann. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist.* 5:185-198. 2000.

Martinelli, G., E. Cocorocchio, P.C. Saletti, R. Orecchia, J. Bernier, N. Tradati, P. Santoro, C. Robertson, F.A. Peccatori, E. Zucca e F. Cavalli. Efficacy of vinblastine, bleomycin, methotrexate (VBM) combination chemotherapy with involved field radiotherapy in early stage (I-IIA) Hodgkin disease patients. *Leuk Lymphoma.* 44:1919-23. 2003.

Matsumoto, Y., T. Shinzato, I. Takai, A. Nishimoto, S. Nakai, T. Sakai, I. Amano e K. Maeda. Peripheral deletion of gamma delta T cells in haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 13:2861-2866. 1998.

Merchant, D., R. Kahn e W. Murphy. Handbook of cell and organ culture. Burgess Publishing, Broken Arrow. 1964.

Meredith, J.E., Jr., S. Winitz, J.M. Lewis, S. Hess, X.D. Ren, M.W. Renshaw e M.A. Schwartz. The regulation of growth and intracellular signaling by integrins. *Endocr Rev.* 17:207-20. 1996.

Meyer, K. The chemistry and biology of mucopolysaccharides and glycoproteins. *Quant. Biol.* 6:91-102. 1938.

Miller, K.D., P.J. Loehrer, R. Gonin e L.H. Einhorn. Salvage chemotherapy with vinblastine, ifosfamide, and cisplatin in recurrent seminoma. *J Clin Oncol.* 15:1427-31. 1997.

Mosesson, M.W. e R.A. Umfleet. The cold-insoluble globulin of human plasma. I. Purification, primary characterization, and relationship to fibrinogen and other cold-insoluble fraction components. *J Biol Chem.* 245:5728-36. 1970.

Mosier, D.E. Separation of macrophages on plastic and glass surfaces. *Methods Enzymol.* 108:294-7. 1984.

Mould, A.P., J.A. Askari e M.J. Humphries. Molecular basis of ligand recognition by integrin alpha 5beta 1. I. Specificity of ligand binding is determined by amino acid sequences in the second and third NH2-terminal repeats of the alpha subunit. *J Biol Chem.* 275:20324-36. 2000.

Muller-Eberhard, H.J. The membrane attack complex. *Springer Semin Immunopathol.* 7:93-141. 1984.

Murdoch, C. e A. Finn. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood.* 95:3032-3043. 2000.

Myers, R.L. Immunology - a laboratory manual. WCB Publishers, Dubuque. 133 pp. 1995.

Nobes, C.D. e A. Hall. Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans.* 23:456-9. 1995.

Noble, R.L., C.T. Beer e J.H. Cutts. Role of chance observations in chemotherapy: Vinca rosea. *Ann N Y Acad Sci.* 76:882-94. 1958.

Norman, P. New drug targets in inflammation and immunomodulation. *Drug News Perspect.* 11:442-7. 1998.

Norris, D.A., R.A. Clark, L.M. Swigart, J.C. Huff, W.L. Weston e S.E. Howell. Fibronectin fragment(s) are chemotactic for human peripheral blood monocytes. *J Immunol.* 129:1612-8. 1982.

Ohashi, M., Joule, J.A., Gilbert, B. e Djerassi, C. The structures of five new Aspidosperma alkaloids related do uleine. *Experientia.* 20:363-364. 1964.

O'Toole, T.E., J.C. Loftus, X.P. Du, A.A. Glass, Z.M. Ruggeri, S.J. Shattil, E.F. Plow e M.H. Ginsberg. Affinity modulation of the alpha IIb beta 3 integrin (platelet GPIIb-IIIa) is an intrinsic property of the receptor. *Cell Regul.* 1:883-93. 1990.

Oppenheim, M.M. e D.L. Rosenstreich. Mitogens in immunobiology. NY Academic Press, New York. 1976.

Pankov, R. e K.M. Yamada. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci.* 115:3861-3. 2002.

Parham, P. O sistema imune. Artmed, Porto Alegre. 372 pp. 2001.

Paul, E.W. The immune system: an introduction. *In* Fundamental Immunology. W.E. Paul, editor. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 1-22. 2003.

Pelletier, A.J., T. Kunicki e V. Quaranta. Activation of the integrin alpha v beta 3 involves a discrete cation-binding site that regulates conformation. *J Biol Chem.* 271:1364-70. 1996.

Perini, C.C. Influência do estado nutricional sobre a expressão de moléculas de adesão em pacientes portadores de insuficiência renal crônica. *In* Departamento de Patologia Médica. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 80. 2003.

Perkins, M.E., T.H. Ji e R.O. Hynes. Cross-linking of fibronectin to sulfated proteoglycans at the cell surface. *Cell.* 16:941-52. 1979

Pierschbacher, M., E.G. Hayman e E. Ruoslahti. Synthetic peptide with cell attachment activity of fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:1224-7. 1983.

Pierschbacher, M.D., E.G. Hayman e E. Ruoslahti. Location of the cell-attachment site in fibronectin with monoclonal antibodies and proteolytic fragments of the molecule. *Cell.* 26:259-67. 1981.

Quesenberry, P.J. e G.A. Colvin. Hematopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. *In* Hematology. E. Beutler, M.A. Lichtman, B.S. Coller, T.J. Kipps, e U. Seligsohn, editors. McGraw-Hill, New York. 153-174. 2001.

Rao, A., C. Luo e P.G. Hogan. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* 15:707-47. 1997.

Rattmann, Y.D., M.R. Terluk, W.M. Souza, C.A.M. Santos, M.W. Biavatti, L.B.H. Torres, S. Mesia-Vela, L. Rieck, J.E. da Silva-Santos e M.C.D. Marques. Effects of alkaloids of *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, on smooth muscle responsiveness. *Journal of Ethnopharmacology.* 100:268-275. 2005.

Reeves, G. e I. Todd. Lectures notes on immunology. Blackwell Science, Oxford. 2000.

Roitt, I.M., D.K. Male e J. Brostoff. Imunologia. Manole, São Paulo. 481 pp. 2003.

Roussel, E. e M.C. Gingras. Transendothelial migration induces rapid expression on neutrophils of granule-release VLA6 used for tissue infiltration. *J Leukoc Biol.* 62:356-62. 1997.

Ruggeri, Z.M., R.A. Houghten, S.R. Russell e T.S. Zimmerman. Inhibition of platelet function with synthetic peptides designed to be high-affinity antagonists of fibrinogen binding to platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:5708-12. 1986.

Ruoslahti, E. Fibronectin and its receptors. *Annual Review of Biochemistry.* 57:375-413. 1988.

Ruoslahti, E. e E. Engvall. Immunochemical and collagen-binding properties of fibronectin. *Ann N Y Acad Sci.* 312:178-91. 1978.

Ruoslahti, E. e M.D. Pierschbacher. Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. *Cell.* 44:517-8. 1986.

Ruoslahti, E. e A. Vaheri. Novel human serum protein from fibroblast plasma membrane. *Nature.* 248:789-91. 1974.

Sanes, J.R., E. Engvall, R. Butkowski e D.D. Hunter. Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. *J Cell Biol.* 111:1685-99. 1990.

Schmutz, J., F. Hunziker e R. Hirt. Ulein, das Hauptalkaloid von *Aspidosperma ulei* Mg. . *Helvetica Chimica Acta.* 40:1189-1200. 1957.

Schraml, P., G. Schwerdtfeger, F. Burkhalter, A. Raggi, D. Schmidt, T. Ruffalo, W. King, K. Wilber, M.J. Mihatsch e H. Moch. Combined array comparative genomic hybridization and tissue microarray analysis suggest PAK1 at 11q13.5-q14 as a critical oncogene target in ovarian carcinoma. *Am J Pathol.* 163:985-92. 2003.

Scott, M.J., J.J. Hoth, S.A. Gardner, J.C. Peyton e W.G. Cheadle. Natural killer cell activation primes macrophages to clear bacterial infection. *Am Surg.* 69:679-86; discussion 686-7. 2003.

Sedgwick, A.D. e D.A. Willoughby. Initiation of the inflammatory response and its prevention. *In Handbook of inflammation.* I.L. Bonta, M.A. Bray, e M.J. Parnham, editors. Elsevier, New York. 27-47. 1985.

Seiffert, D. Constitutive and regulated expression of vitronectin. *Histol Histopathol.* 12:787-97. 1997.

Shapiro, H.M. Practical flow cytometry. Alan R. Liss, Inc., New York. 1985.

Shimizu, Y., G.A. Van Seventer, K.J. Horgan e S. Shaw. Costimulation of proliferative responses of resting CD4+ T cells by the interaction of VLA-4 and VLA-5 with fibronectin or VLA-6 with laminin. *The Journal of Immunology*. 145:59-67. 1990a.

Shimizu, Y., G.A. Van Seventer, K.J. Horgan e S. Shaw. Regulated expression and function of three VLA ( ) integrin receptors on T cells. *Nature*. 345:250. 1990b.

Silva, M.O.R. Brief history of inflammation. *In Handbook of experimental pharmacology*. J.R. Vane e S.H. Ferreira, editors. Springer-Verlag, New York. 6-25. 1978.

Simmons, D.L. The role of ICAM expression in immunity and disease. *Cancer Surveys: Cell Adhesion and Cancer*. 25:141. 1995.

Skorstengaard, K., M.S. Jensen, P. Sahl, T.E. Petersen e S. Magnusson. Complete primary structure of bovine plasma fibronectin. *Eur J Biochem*. 161:441-53. 1986.

Skorstengaard, K., H.C. Thogersen e T.E. Petersen. Complete primary structure of the collagen-binding domain of bovine fibronectin. *Eur J Biochem*. 140:235-43. 1984.

Smith, C.W., J.C. Hollers, R.A. Patrick e C. Hassett. Motility and adhesiveness in human neutrophils. Effects of chemotactic factors. *Journal of Clinical Investigation*. 63:221-229. 1979.

Smith, K.A. e D.A. Cantrell. Interleukin 2 regulates its own receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82:864-8. 1985.

Springer, T.A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 346:425-434. 1990.

Springer, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multi-step paradigm. *Cell*. 76:301-314. 1994.

St-Pierre, Y., P. Hugo, D. Legault, P. Tremblay e E.F. Potworowski. Modulation of integrin-mediated intercellular adhesion during the interaction of thymocytes with stromal cells expressing VLA-4 e LFA-1 ligands. *European Journal of Immunology*. 26:2050-2055. 1996.

Stary, F. The Natural Guide to Medicinal Herbs and Plants. Books International, London. 1998.

Stupack, D.G., S. Stewart, W.G. Carter, E.A. Wayner e J.A. Wilkins. B lymphocyte fibronectin receptors: expression and utilization. *Scand J Immunol*. 34:761-9. 1991.



Suzuki, S., A. Oldberg, E.G. Hayman, M.D. Pierschbacher e E. Ruoslahti. Complete amino acid sequence of human vitronectin deduced from cDNA. Similarity of cell attachment sites in vitronectin and fibronectin. *Embo J.* 4:2519-24. 1985.

Suzuki, S., M.D. Pierschbacher, E.G. Hayman, K. Nguyen, Y. Ohgren e E. Ruoslahti. Domain structure of vitronectin. Alignment of active sites. *J Biol Chem.* 259:15307-14. 1984.

Svoboda, G.H. A note on several new alkaloids from *Vinca rosea* Linn. I. Leurosine, virosine, perivine. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim).* 47:834. 1958.

Szeberenyi, J.B., G. Rothe, E. Pallinger, E. Orso, A. Falus e G. Schmitz. Multi-color analysis of monocyte and dendritic cell precursor heterogeneity in whole blood. *Immunobiology.* 202:51-58. 2000.

Tielemans, C., J.P. Delville, C.P. Husson, P. Madhoun, A.M. Lambrechts e M. Goldman. Adhesion molecules and leukocyte common antigen on monocytes and granulocytes during hemodialysis. *Clinical Nephrology.* 39:158-165. 1993.

Tomasini, B.R. e D.F. Mosher. Vitronectin. *Prog Hemost Thromb.* 10:269-305. 1991.

Trama, J., Q. Lu, R.G. Hawley e S.N. Ho. The NFAT-related protein NFATL1 (TonEBP/NFAT5) is induced upon T cell activation in a calcineurin-dependent manner. *J Immunol.* 165:4884-94. 2000.

Trial, J., R.E. Baughn, J.N. Wygant, B.W. McIntyre, H.H. Birdsall, K.A. Youker, A. Evans, M.L. Entman e R.D. Rossen. Fibronectin fragments modulate monocyte VLA-5 expression and monocyte migration. *J Clin Invest.* 104:419-30. 1999.

Ugarova, T.P., C. Zamarron, Y. Veklich, R.D. Bowditch, M.H. Ginsberg, J.W. Weisel e E.F. Plow. Conformational transitions in the cell binding domain of fibronectin. *Biochemistry.* 34:4457-66. 1995.

Wayner, E.A., A. Garcia-Pardo, M.J. Humphries, J.A. McDonald e W.G. Carter. Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *J Cell Biol.* 109:1321-30. 1989.

Weber, C., J. Kitayama e T.A. Springer. Differential regulation of beta 1 and beta 2 integrin avidity by chemoattractants in eosinophils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:10939-44. 1996.

Willianson, E.M., D.T. Okpako e F.J. Evans. Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. *In* Pharmaceutical methods in phytotherapy research. Wiley, Chechester. 1996.

Winslow, L.C. e D.J. Kroll. Herbs as Medicines. *Archive International of Medicine*. 158:2192-2199. 1998.

Woods, A., J.B. McCarthy, L.T. Furcht e J.R. Couchman. A synthetic peptide from the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin promotes focal adhesion formation. *Mol Biol Cell*. 4:605-13. 1993.

Woodson, R.E. *Annals of Missouri Botanical Garden*. 1938.

Worthylake, R.A., S. Lemoine, J.M. Watson e K. Burridge. RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J Cell Biol*. 154:147-60. 2001.

Wright, S.D. e P.A. Detmers. Adhesion-promoting receptors on phagocytes. *Journal of Cell Science Suppl*. 9:99-120. 1988.

Yamada, K.M. e D.W. Kennedy. Fibroblast cellular and plasma fibronectins are similar but not identical. *J Cell Biol*. 80:492-8. 1979.

Zachee, P., R. Daelemans, P. Pollaris, M.A. Boogaerts e R.L. Lins. Neutrophil adhesion molecules in chronic hemodialysis patients. *Nephron*. 68:192-196. 1994.

Zarkovic, N., T. Vukovic, I. Loncaric, M. Miletic, K. Zarkovic, S. Borovic, A. Cipak, S. Sabolovic, M. Konitzer e S. Mang. An overview on anticancer activities of the *Viscum album* extract Isorel. *Cancer biother radiopharm*. 16:55-62. 2001.